

**MESTRADO EM CIÊNCIAS DO MAR – RECURSOS MARINHOS**

**ESPECIALIZAÇÃO EM AQUACULTURA E PESCAS**

**Estágio na maternidade de linguado Safistela, Lda.  
Otimização das dietas para desmame de *Solea  
senegalensis* em condições de produção**

Augusto da Silva Furtado

**M**

2016





Augusto Filipe da Silva Furtado

**Estágio na maternidade de linguado Safistela, Lda  
Otimização das dietas de desmame de *Solea senegalensis* em  
condições de produção**

Mestrado em Ciências do Mar –  
Recursos Marinhos, Especialização em  
Aquacultura e Pescas.

Instituto Ciências Biomédicas Abel  
Salazar, Universidade do Porto.

Orientador: Professor Doutor José  
Fernando Magalhães Gonçalves

Afiliação: Instituto Ciências Biomédicas  
Abel Salazar, Universidade do Porto

Coorientadora: Dra. Renata Serradeiro

Afiliação: Grupo Sea8

## Aviso Legal

Esta dissertação foi realizada no âmbito de Mestrado em Ciências do Mar – Recursos Marinhos, no Instituto Ciências Biomédicas Abel Salazar, Porto, e teve o apoio de 3 principais empresas, nomeadamente: PROMAR, SPAROS e SEA8.

A informação contida nesta dissertação encontra-se restringida, isto deve-se à aplicação de acordos de confidencialidade por parte das empresas interessadas neste projeto.

## Legal Disclaimer

This dissertation was fulfilled in the extent of the Master's Course in Marine Sciences – Marine Resources, in Instituto Ciências Biomédicas Abel Salazar, Porto, with the support of 3 companies, namely: PROMAR, SPAROS e SEA8.

All the information included in this dissertation is found under confidentiality agreements, by part of the interested companies in this project

## Agradecimentos

Este trabalho foi suportado pelo projeto SOLEAWIN (31305/FEP/71), parcialmente financiado pelo programa PROMAR (Portugal) com fundos FEDER.

Em primeiro lugar gostaria de agradecer ao meu orientador Professor Doutor José Fernando Magalhães Gonçalves pela oportunidade que me proporcionou em estagiar na maternidade de linguado Senegalês Safistela, pelo apoio com o ensaio e análise dos resultados como também pela ajuda com a escrita da dissertação.

Estou eternamente grato pela oportunidade, aconselhamento, orientação e apoio incondicional que a minha coorientadora Dra. Renata Serradeiro me proporcionou durante o estágio, ensaio e todo o meu processo de conclusão da dissertação.

O meu completo agradecimento ao Prof. Dr. Wilson Pinto pela orientação e apoio absoluto que proporcionou durante o ensaio e posterior análise e tratamento dos dados obtidos.

Gostaria de agradecer a toda a equipe da Safistela pelo apoio diário e pela experiência inesquecível que foi trabalhar com eles, tornando este ano espetacular.

Por último gostaria de dar o meu agradecimento total aos meus amigos e família pelo carinho, tolerância e apoio que me têm dado ao longo de todo o processo. Em especial à minha irmã Inês Furtado e amigos Joana Costa, Joana Mendes, João Pereira, Luís Baião, Manuela Bertão, Marta Moutinho e Tiago Sá

## Índice

Agradecimentos.....	6
Lista de figuras .....	9
Lista das tabelas.....	10
Lista de abreviaturas.....	11
Abstract .....	12
Resumo .....	13
I. Introdução.....	14
1. Aquacultura.....	15
2. <i>Solea senegalensis</i> (Kaup, 1856).....	18
3. Principais problemas associados ao cultivo da espécie <i>S. senegalensis</i> .....	19
3.1. Nutrição.....	19
3.1.1. Desmame (Weaning).....	22
3.2. Patologia .....	22
3.2.1. <i>Hemibdella soleas</i> .....	22
3.2.2. Pasteurelose.....	23
3.2.3. Vibriose .....	23
3.2.4. Tenacibaculiose.....	23
3.3. Diferentes fases de cultivo .....	24
3.3.1. Progenitores .....	24
3.3.2. Incubação.....	24
3.3.3. Crescimento Larvar .....	24
3.3.4. Engorda.....	25
II. Estágio na maternidade e pré-engorda de <i>Solea Senegalensis</i> , Safistela, Lda. ....	26
1. Introdução à instalação aquícola, Safistela, Lda.....	27
2. As instalações .....	28
2.1 Área dos progenitores (“broodstock”) .....	28
2.2 Sala de incubação.....	30

2.3	Sala das larvas.....	32
2.4	Sala do alimento vivo .....	35
2.5	Sala dos rotíferos .....	35
2.6	Sala das artémias .....	36
2.7	Área do Desmame .....	38
2.8	Área da Pré-Engorda .....	41
2.9	Sistema de Recirculação de Água em Aquacultura (RAS) .....	42
2.9.1	Objetivo de um Sistema RAS.....	43
2.9.2	Sistema RAS na Safistela Lda. ....	44
3.	Rotinas diárias na empresa Safistela Lda. ....	45
3.1	Área do desmame.....	45
3.2	Salas do alimento vivo .....	46
3.3	Área dos Reprodutores .....	47
3.4	Área da pré-engorda .....	48
III.	Otimização de dietas de desmame de <i>Solea senegalensis</i> em condições de produção.....	49
1.	Objetivo do ensaio .....	50
2.	Materiais e métodos .....	51
2.1	Procedimento experimental.....	51
2.2	Amostragem.....	55
2.3	Manutenção .....	55
2.4	Análise estatística .....	55
3.	Resultados .....	58
3.1	Peso seco e comprimento total .....	58
3.2	Fator de conversão alimentar.....	62
3.3	Taxa de crescimento relativa.....	63
4.	Discussão .....	64
IV.	Conclusão .....	67
	Bibliografia.....	69



## Lista de figuras

Figura 1 - Produção Mundial da Aquacultura e Pesca (FAO 2016).....	15
Figura 2 - Esquema representativo dos diferentes tipos de regime e respetivas alimentações – (De Silva and Hasan, 2007).....	16
Figura 3 - Evolução nos valores de produção de diferentes espécies em Portugal, em 2014 – Federation of European Aquaculture Producers.....	17
Figura 4 - Estimativa da produção aquícola e pesqueira e seu consumo até 2025 – de FAO, 2016. ....	18
Figura 5 - Exemplar da espécie <i>Solea senegalensis</i> – fotografia de Canosa, C. & B. F. Souto. ....	18
Figura 6 - Entrada para as instalações da Safistela, Lda.– Póvoa de Varzim. ....	27
Figura 7 - Exemplares de <i>S. senegalensis</i> adultos selvagens em tanques quadrados.....	29
Figura 8 - Sala de incubação – Imagem cedida por Luís Baião. ....	31
Figura 9 - Sala das larvas. ....	32
Figura 10 - Exemplo de um tanque de produção larvar. ....	33
Figura 11 - Tanque de produção de rotíferos. ....	36
Figura 12 - Tanque cilindro-cónico usado na produção de artémia. ....	37
Figura 13 - Leiteira usada para conservar artémia enriquecida. ....	38
Figura 14 - Zona de desmame na Safistela Lda. - imagem cedida por Luís Baião.....	39
Figura 15 - Raceways da zona da pré-engorda, Safistela, Lda.....	41
Figura 16 - Sistema de produção criado para o ensaio experimental. ....	51
Figura 17 - Tanque usado no ensaio demonstrando a coluna de água e o sistema de esgoto.....	52
Figura 18 - Alimentador automático com a ração distribuída a ser administrada durante 18 horas, em formato semi-contínuo. ....	52
Figura 19 - Peso seco (mg) aos 31, 45 e 70 DAH dos linguados. Letras diferentes representam diferenças significativas entre dietas ( $p < 0,05$ ), $n=30$ . ....	59
Figura 20 - Comprimento total (mm) aos 31, 45 e 70 DAH dos linguados. Letras diferentes representam diferenças significativas entre dietas ( $p < 0,05$ ), $n=30$ . ....	60
Figura 21 - FCR dos diferentes tratamentos. Letras diferentes representam diferenças significativas entre as dietas ( $p < 0,05$ ), $n=30$ . ....	62
Figura 22 - RGR dos diferentes tratamentos. Letras diferentes representam diferenças significativas entre as dietas ( $p < 0,05$ ), $n=30$ . ....	63

## Lista das tabelas

Tabela 1 - Protocolo dos tratamentos experimentais .....	54
Tabela 2 - composição das dietas experimentais. ....	54
Tabela 3 - crescimento médio de cada tratamento.....	58
Tabela 4 - Número total de indivíduos no início do ensaio .....	61
Tabela 5 - Taxas de sobrevivência entre os diferentes tratamentos .....	62

## Lista de abreviaturas

**AB** – Aumento da Biomassa

**ARA** – Ácido Araquidônico

**DAH** – Days After Hatching (Dias Após Eclosão)

**DHA** - Ácido Docosa-hexaenoico

**DOM** – Dissolved Organic Matter (Matéria Orgânica Dissolvida)

**DW** – Dry Weight (Peso Seco)

**ECP** – Extracellular Products (Produtos extracelulares)

**EFA** – Essential Fatty Acids (Ácidos Gordos Essenciais)

**EPA** – Ácido Eicosapentaenoico LOA

**FCR** – Taxa de conversão alimentar

**HUFA** – Highly Unsaturated Fatty Acid (Ácidos Gordos Altamente Insaturados)

**LC-PUFA** – Long Chain Poliunsaturated Fatty Acids (Ácidos Gordos Polinsaturados de Cadeia Longa)

**NaOH** – Hidróxido de Sódio

**POM** – Particulate Organic Matter (Matéria Orgânica em Partículas)

**PPM** – Partes Por Milhão

**PUFA** – Poliunsaturated Fatty Acids (Ácidos Gordos Polinsaturados)

**RAS** - Recirculating Aquaculture System (Sistema de recirculação em Aquacultura)

**RGR** – Relative Growth Rate (Taxa de Crescimento Relativo)

**SR** – Survival Rate (Taxa de sobrevivência)

**TI** – Transformação Logarítmica

**TL** – Total Length (comprimento total)

**Tp** – Transformação Percentual

## Abstract

**Introduction:** Aquaculture is a field in animal production dedicated to aquatic animals and it represents an important sector in the world's economy. There is increasing investment in this field and Portugal is no exception. Portugal produced around 5.800 tons of fish in 2014 with 60 tons being attributed to *Solea senegalensis*. A species of flat fish with high market value, the *S. senegalensis* is produced by Sea8 Company - in Portugal. This company is divided in two parts: the maternity Safiestela Sustainable Aquafarming Investments Lda (Safistela, Lda.) and the on-growing site Aquacria Píscicolas S.A.. One of the biggest economic expenses in aquaculture is the feeding regime given to animals. The commercial diets contain mainly marine sourced oils and proteins, therefore increasing their price. Accordingly, one of the main goals of the aquaculture community is the substitution of current diet compounds for more economic feed ingredients - thus trying to achieve sustainable aquaculture. **Aim and methods:** The trial conducted for this dissertation had the objective of optimizing the weaning diet of *S. senegalensis* in production conditions and comparing the correspondent growth evolution (in weight and length) when submitted to different diets. The control was a commercial diet with marine sourced oils and proteins, and diets with variable conjunctions of plant sourced oils and proteins. **Results and discussion:** It was observed that diet G4, with a 50% inclusion of plant sourced protein, obtained best results in terms of growth. Moreover, diet G1\_V2, which consisted entirely of plant oils and proteins, obtained the least favorable results, leading to the belief that total substitution of the marine sourced oils and proteins is not beneficial for a best growth evolution. **Conclusion:** In conclusion, a moderate substitution of marine ingredients for plant ingredients may improve the development of the fish, reduce production costs and, ultimately, increase sustainability.

**Key-words:** Aquaculture, *Solea senegalensis*, Safistela, weaning diets, marine sourced oils and proteins, plant sourced oils and plant, sustainability

## Resumo

**Introdução:** A aquacultura é a área de produção animal dedicada aos animais aquáticos e representa um importante sector na economia mundial. Cada vez mais existe investimento nesta área e Portugal não é exceção. Portugal produziu cerca de 5.800 toneladas de pescado em 2014, sendo que 60 toneladas foram de *Solea senegalensis*. O *S. senegalensis* é uma espécie de peixe plano com elevado valor comercial e é produzido em Portugal pela empresa Sea8. Esta empresa encontra-se dividida em duas partes: a maternidade Safistela Sustainable Aquafarming Investments, Lda (Safistela, Lda.) e a zona de engorda Aquacria Píscicolas, S.A.. Em aquacultura um dos maiores gastos económicos é na alimentação dada aos animais. As dietas comerciais são constituídas maioritariamente por farinha e óleo de peixe fazendo com que os preços das rações sejam altos. Deste modo, um dos maiores objetivos da comunidade aquícola é a alteração da composição destas dietas para composições mais económicas, com a ideia de tornar a aquacultura um negócio mais sustentável. **Métodos e Objetivo:** O ensaio realizado nesta dissertação teve como objetivo principal a otimização de dietas para desmame de *S. senegalensis* em condições de produção, comparando a evolução do crescimento e do peso quando sujeitos a diferentes dietas. Em comparação estavam a dieta controlo, que era uma ração comercial com fontes de proteína e óleo animal, e dietas com diferentes níveis de inclusão de óleos e proteínas vegetais. **Resultados e discussão:** Foi observado que a dieta G4 com inclusão em cerca de 50% de proteínas vegetais, na sua constituição, obteve melhores resultados em termos de crescimento. Em contrapartida, a dieta G1\_V2 que era constituída inteiramente por proteína e óleo vegetal obteve os piores resultados, levando a acreditar que uma substituição total dos óleos e proteínas animais não seja benéfico para o bom desenvolvimento dos peixes. **Conclusão:** Conclui-se que uma alteração moderada das dietas ricas em constituintes de fonte animal para dietas com inclusão de óleos e proteínas vegetais pode vir a melhorar o desenvolvimento dos peixes e baixar os custos de produção, tornando o negócio mais sustentável.

**Palavras-chave:** Aquacultura, *Solea senegalensis*, Safistela, dietas de desmame, proteínas e óleos de fonte animal, proteínas e óleos de fonte vegetal, sustentabilidade

# I. Introdução

## 1. Aquacultura

A produção de animais aquáticos – peixes, moluscos, crustáceos e plantas aquáticas – é denominada de Aquacultura, representando uma das fontes mais importantes de alimento e nutrição para a população mundial. Segundo registos realizados pela FAO (Food and Agriculture organization of the United Nation) os valores de consumo de peixe, mundialmente, atingiram os 20Kg *per capita*.

A obtenção de animais aquáticos passou a ser adquirida de forma equivalente entre a aquacultura e a pesca, quando outrora fora capturada maioritariamente em ambiente selvagem. Atingiram-se marcos importantes na história da Aquacultura, quando em 2014 a produção de animais aquáticos se destacou em relação à pesca de animais selvagens (figura 1), assegurando uma nova era de sustentabilidade. Sublinha-se a importância deste desenvolvimento, pois a aquacultura representa uma vital fonte de peixe para as populações: cerca de 7% em 1974 e 39% em 2004 (FAO, 2016).

WORLD FISHERIES AND AQUACULTURE PRODUCTION						
	2009	2010	2011	2012	2013	2014
(Million tonnes)						
PRODUCTION						
Capture						
Inland	10.5	11.3	11.1	11.6	11.7	11.9
Marine	79.7	77.9	82.6	79.7	81.0	81.5
Total capture	90.2	89.1	93.7	91.3	92.7	93.4
Aquaculture						
Inland	34.3	36.9	38.6	42.0	44.8	47.1
Marine	21.4	22.1	23.2	24.4	25.5	26.7
Total aquaculture	55.7	59.0	61.8	66.5	70.3	73.8
TOTAL	145.9	148.1	155.5	157.8	162.9	167.2

Figura 1 - Produção Mundial da Aquacultura e Pesca (FAO 2016).

Cada vez mais existe a necessidade de produzir e obter maiores quantidades de peixe, de modo a garantir alimento para a população mundial. Em 2013 o peixe providenciou 3.1 biliões de pessoas em cerca de 20% do seu consumo médio *per capita* de proteína animal. Sendo este recurso rico em fontes nutritivas como: proteínas de fácil digestão contendo aminoácidos essenciais, gorduras essenciais (ácidos gordos de cadeia longa ómega-3), vitaminas (A, B e D) e incluindo minerais (cálcio, zinco e ferro), será cada vez mais procurado e desta forma a produção terá de aumentar (FAO, 2016).

Existem três tipos de regimes diferentes de produção em Aquacultura de acordo com a capacidade da sua produção e tipo de peixe produzido, nomeadamente: intensivo, semi-intensivo e extensivo (figura 2). No sistema intensivo o regime alimentar é artificial e a capacidade de produção é elevada, no regime semi-intensivo o regime alimentar é uma junção entre alimento artificial e natural e a capacidade de produção é inferior à da intensiva, por fim no regime extensivo a alimentação é 100% natural e a capacidade de produção é baixa (INE, 2014).

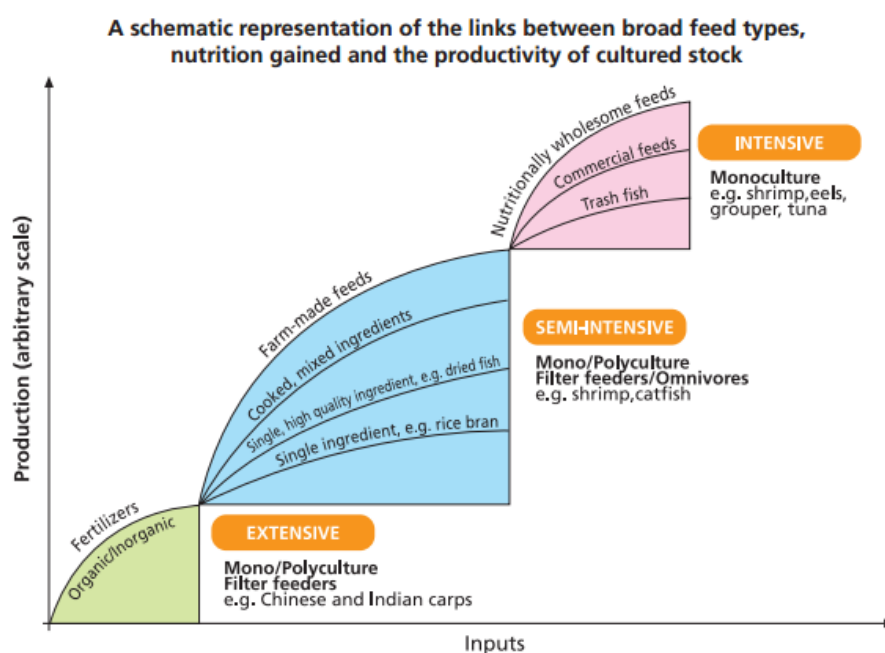


Figura 2 - Esquema representativo dos diferentes tipos de regime e respetivas alimentações – (De Silva and Hasan, 2007).

Em 2014 a produção de peixe em aquacultura na Europa foi cerca de 2.341.000 toneladas, sendo a Noruega a maior contribuidora com 1.370.000 toneladas. Portugal contribuiu com 5.760 toneladas, sendo o 20º país europeu a produzir mais (FEAP, 2014).

Em Portugal as espécies de água doce são maioritariamente produzidas em sistema intensivo e as espécies marinhas são produzidas cerca de 43% extensivamente, 45% intensivamente e 12% em regime semi-intensivo (INE, 2014). As principais espécies de peixe que Portugal produz são, respetivamente: Pregado (*Psetta maxima*), Dourada (*Sparus aurata*), Truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), Robalo (*Dicentrarchus labrax*) e Linguado (*Solea senegalensis*), em que o Pregado é a espécie mais explorada (figura 3). Produz-se também ameijoia (*Ruditapes decussatus*), mexilhão (*Mytilus edulis*) e ostra (*Crassostrea sp.*).



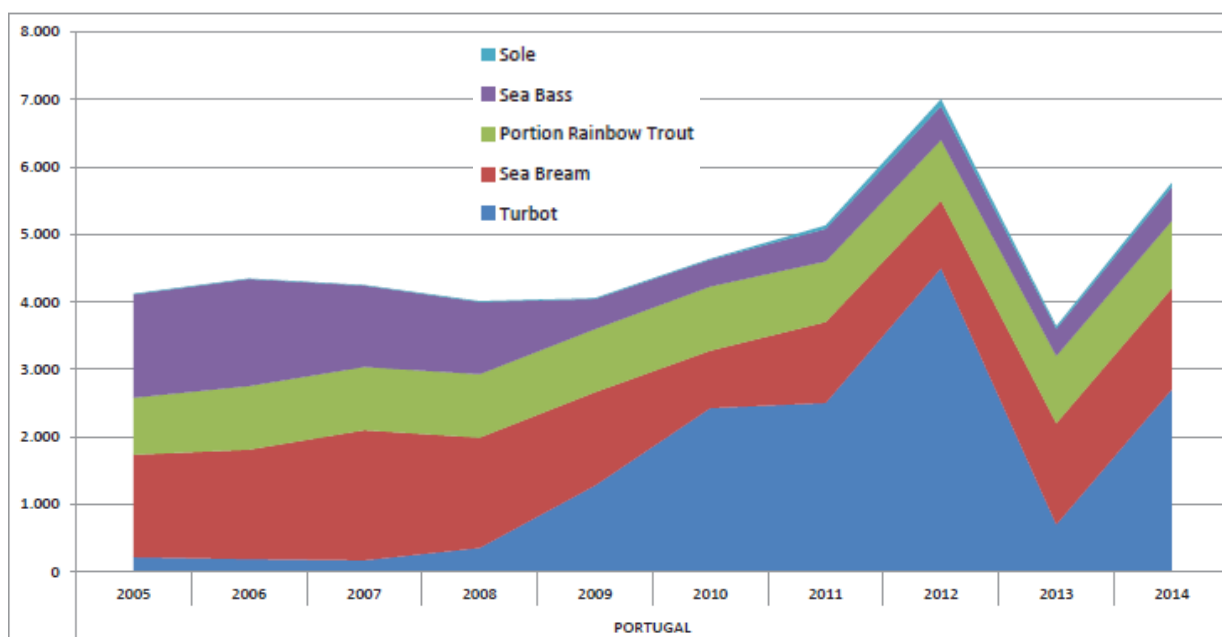


Figura 3 - Evolução nos valores de produção de diferentes espécies em Portugal, em 2014 – Federation of European Aquaculture Producers (FEAP).

Contudo Portugal é um país com grande apetência para a aquacultura, por isso é de esperar um crescimento desta área nos próximos anos. Tem-se vindo a investir na produção de espécies não tão comuns na dieta e quotidiano de um português, como é o caso do Linguado (*S. senegalensis*). Esta espécie tem vindo a ser introduzida no mercado português ao longo dos anos e o seu crescimento de produção tem sido de forma modesta, passando das 11 toneladas em 2005 para as 60 toneladas em 2014 (FEAP, 2014).

Alguns dos problemas que podem implicar com o crescimento deste sector em Portugal e no resto do mundo são: conflitos associados a recursos como a água e terreno, alimentação dos peixes e recursos genéticos, integridade ambiental e problemas com doenças, desenvolvimento e adoção de novos métodos de produção, segurança alimentar, vendas no mercado internacional, mudanças climáticas, impedimentos de investimento de capital e problemas originados com a prática de aquacultura não oficial.

Apesar de todos os possíveis problemas que podem surgir, acredita-se que o mercado da aquacultura venha a evoluir até 2025 atingindo as 195 milhões de toneladas mundiais e que o consumo de peixe proveniente da aquacultura seja superior ao da pesca (figura 4), ajudando assim a manter os *stocks* de peixes e evitar a sobre-exploração da pesca (FAO, 2016).

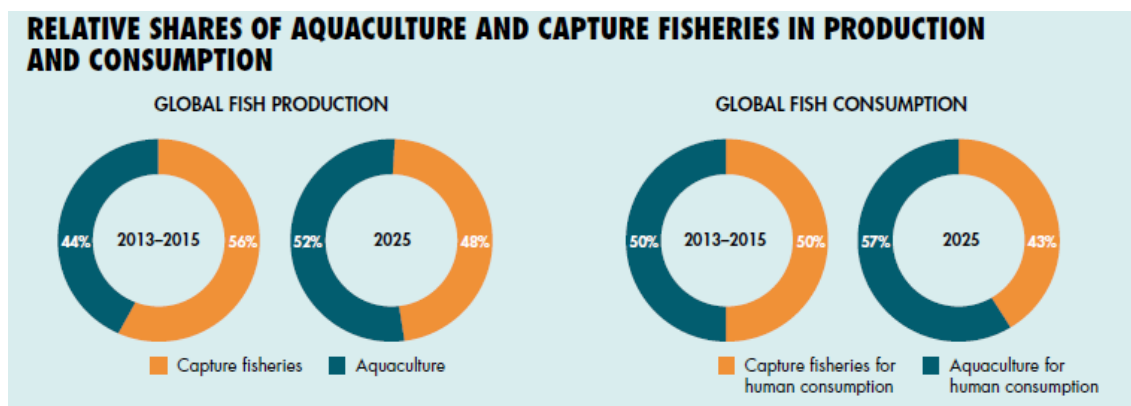


Figura 4 - Estimativa da produção aquícola e pesqueira e seu consumo até 2025 – de FAO, 2016.

A Aquicultura é uma área de produção animal capaz de sustentar a necessidade nutritiva mundial. Se aumentar a sustentabilidade com novas formas e práticas que nos permitam desenvolver o crescimento de produção e diminuir o impacto ambiental que esta ainda acarreta.

## 2. *Solea senegalensis* (Kaup, 1856)

O linguado Senegalês (*Solea senegalensis* - Kaup, 1856) (figura 5) é um peixe, que pertence à família *Soleidae*, de forma achatada e oval com corpo assimétrico, onde os olhos permanecem no lado direito do corpo, também chamado de lado ocular, após a metamorfose da fase larvar para a fase juvenil. Esta espécie é muitas vezes confundida com a *Solea solea* que apresenta uma mancha preta na parte posterior da barbatana peitoral, ao contrário do *S. senegalensis* que tem as membranas inter-radiais da barbatana peitoral de cor preta (FishBase, 2015).



Figura 5 - Exemplo da espécie *Solea senegalensis* – fotografia de Canosa, C. & B. F. Souto.

São peixes marinhos ou de águas salobras (30 a 35 ppt), demersais ou bentônicos, ou seja, que vivem associados ao substrato, habitam na costa até cerca de 100m de profundidade (FAO, 2016) e aguentam temperaturas entre os 13 e 28 °C (Vinagre *et al.*, 2006). Os adultos alimentam-se de pequenos invertebrados bentônicos, principalmente poliquetas e moluscos e por vezes de pequenos crustáceos (Cabral, 2000; FAO, 2016).

As fêmeas atingem a maturidade sexual aos 3 anos de idade com um comprimento total de cerca de 32cm. A desova, após a reprodução, é altamente dependente da temperatura da água. Assim sendo, a época ideal de desova ocorre entre Maio e Agosto, devido às temperaturas da água serem mais quentes, na zona da península ibérica, que variam entre os 15 e 20 °C (FAO, 2016).

### 3. Principais problemas associados ao cultivo da espécie *S. senegalensis*.

#### 3.1. Nutrição

Um dos maiores impedimentos do crescimento, futuro, e da sustentabilidade da indústria aquícola é o uso de óleo de peixe nas dietas de produção. O óleo de peixe é o fornecedor principal de ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa benéficos para a saúde e tem variações drásticas na disponibilidade e custo, visto que é extraído insustentavelmente dos oceanos. Cerca de 90% da produção global de óleo de peixe é usado pela aquacultura, levando a um aumento constante da procura e por sua vez ultrapassando a sua produção (Borges *et al.*, 2014). Deste modo, o uso de óleo de peixe tem gerado debates e discussões em todo o mundo, que resultou numa crescente geração de investigadores dedicados a estudar formas de reduzir a dependência que a indústria aquícola tem com este recurso (Sena *et al.*, 2010).

Um dos requerimentos dietéticos para os vertebrados, enquanto espécie, é o consumo de ácidos gordos polinsaturados (PUFA) específicos, muitas vezes denominados de ácidos gordos essenciais (EFA). Os indivíduos que tenham deficiência destes compostos, podem vir a desenvolver patologias e doenças resultando por vezes em elevada mortalidade (Das, 2006).

A investigação de lípidos dietéticos na nutrição de peixes, particularmente no início da fase de desenvolvimento, tem sido focada, principalmente, nas formas ativas dos EFA, nomeadamente três ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa (LC-PUFA): ácido araquidônico (ARA, 20:4n-6), ácido docosa-hexaenoico (DHA, 22:6n-3) e ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5n-3). Estes ácidos assumem o papel principal em muitas funções e processos biológicos, nos peixes marinhos, incluindo resposta ao *stress*, sobrevivência, comportamento e crescimento (Sargent *et al.*, 1999; Hamre *et al.*, 2013; Pinto *et al.*, 2016).

Uma vez que o óleo de peixe é uma fonte essencial de LC-PUFA para os peixes marinhos, estudos específicos focam-se na determinação dos requerimentos de EFA que estes têm. Apesar de não haver uma abundância de estudos nesta área (Tocher and Sargent, 1984; Tocher, 2010), é geralmente aceite que os requerimentos de EFA sejam maiores em fases adultas do que em estado juvenil e em muitos casos é fornecido valores de EFA em excesso para assegurar as necessidades metabólicas (Sargent *et al.*, 1997).

Com a falta de estudos determinantes no conhecimento dos requisitos que os peixes marinhos têm em EFA, Tocher (2010) reuniu alguns valores quantitativos, previamente conhecidos, requeridos pelas larvas e juvenis de diferentes espécies e observou que algumas espécies, como a Dourada (*Sparus aurata*), tinham altos requisitos em DHA.

A espécie *S. senegalensis* é um peixe plano, importante na diversificação da aquacultura em países do Oeste e Sul da Europa (Imsland *et al.*, 2003; Conceição *et al.*, 2007; Morais *et al.*, 2014a; Dinis *et al.*, 1999) que beneficia com elevados valores dietéticos de LC-PUFAs durante a fase larvar e pós-larvar, levando assim a resultados de alto crescimento e sobrevivência (Bonacic *et al.*, 2016).

Com a sobre-exploração da pesca e com a escassez e valor elevado que o peixe selvagem tem, o uso de óleo de peixe nas dietas para peixe tem sido considerado insustentável e por isso tem-se procurado por outras alternativas. O óleo vegetal apresenta-se como uma alternativa sustentável ao uso de óleo de peixe (Benítez-Dorta *et al.*, 2013; Moreira *et al.*, 2014; Reis *et al.*, 2014), uma vez que existe em grandes quantidades, sendo o seu preço baixo. Os óleos vegetais são fontes de PUFA de cadeia n-6 e n-9, como o ácido linoleico (18:2 n-6 – LOA) (Torstensen *et al.*, 2008; Benítez-Dorta *et al.*, 2013; Borges *et al.*, 2014). Em contrapartida carecem, na sua constituição, de EPA e DHA, resultando numa falta de requisitos de ácidos gordos essenciais ao desenvolvimento dos peixes marinhos. Deste modo é necessária a incorporação de óleo

de peixe na dieta, para garantir quantidades ideais de ácidos gordos essenciais a estes animais, sendo por isso considerada uma das maiores barreiras na substituição de óleos de peixe por óleo vegetal (Reis *et al.*, 2014).

A mistura de vários óleos vegetais pode ajudar a ajustar o perfil de ácidos gordos da dieta, e, por isso facilitar a sua incorporação nas dietas dadas aos peixes (Torstensen *et al.*, 2008; Benítez-Dorta *et al.*, 2013; Reis *et al.*, 2014). Contudo, apesar da mistura de vários óleos de origem vegetal, os ácidos gordos essenciais, como DHA e EPA, não estão presentes na sua constituição, apresentando um problema para a saúde e desenvolvimento do animal (Torstensen *et al.*, 2008). A junção de óleo de peixe e de óleo vegetal parece ajudar a reduzir os valores de óleo de peixe usados na dieta sem comprometer a saúde do animal, uma vez que esta tem de ser criteriosamente avaliada, pois a redução de óleo de peixe e o aumento de óleo vegetal nas rações pode reduzir a resistência a agentes patogénicos e alterar alguns parâmetros do sistema imunitário (Torstensen *et al.*, 2008; Benítez-Dorta *et al.*, 2013; Reis *et al.*, 2014).

Torstensen (2008) descreveu que o salmão do Atlântico não sofre redução do crescimento quando o óleo de peixe foi substituído, na totalidade, por óleos vegetais, mesmo sendo a farinha de peixe a única fonte de ácidos gordos de cadeia longa n-3. Num ensaio, realizado por Reis (2014), com juvenis de *S. senegalensis* com o objetivo de analisar as diferenças no crescimento e eficiência da substituição completa de óleo de peixe por óleo de linhaça, verificou-se que não houve diferenças e que o nível de DHA do músculo dos juvenis, alimentados com dietas de origem vegetal, era semelhante ao observado nos juvenis alimentados com dietas de origem animal.

Por outro lado Turchini (2009) verificou que noutras espécies de peixe produzida em Aquacultura, a substituição de óleos de peixe por óleos vegetais leva a uma alteração da composição dos ácidos gordos nos músculos. Por isso, de modo a combater esta alteração, alguns autores defendem a possibilidade de alimentar os peixes de aquacultura com uma nutrição baixa em óleos de peixe durante todo o processo de produção, exceto antes da sua comercialização onde é introduzida uma dieta denominada de dieta de finalização, rica em óleo de peixe, que permite restabelecer os níveis de ácidos gordos no animal. Deste modo garante-se um elevado teor de PUFA ao consumidor final, fazendo aproximar o peixe produzido em Aquacultura daquele pescado no meio selvagem (Reis *et al.*, 2014)

### 3.1.1. Desmame (Weaning)

O desmame, em inglês *weaning*, é a ação de parar a nutrição de um tipo de alimento e começar a administração de outro. Em meio natural as larvas de peixe alimentam-se de pequenos crustáceos e algas para depois, numa fase juvenil, começarem a alimentar-se de moluscos, peixes e crustáceos de maior porte.

Em meio de produção o processo de desmame ocorre quando as larvas de peixe passam de alimento vivo para alimento artificial e inerte (*pellets*) e isso acontece, normalmente, através da passagem gradual de um tipo para outro, havendo uma fase em que se administra conjuntamente alimento vivo com alimento artificial de modo a ajudar a garantir que o desmame seja 100% eficaz (Lucas and Southgate, 2012).

A Aquacultura de regime extensivo e semi-intensivo acaba por ter algumas semelhanças com o meio natural, no que toca a regimes alimentares na fase de desmame, mas isso não seria viável monetariamente para Aquaculturas de regime intensivo, pois estas esperam obter o maior lucro com o menor custo de produção. Deste modo desenvolveram-se métodos sustentáveis de alimentar os indivíduos através da administração de alimento artificial. Assim, muitas Aquaculturas de regime intensivo optam por fazer um desmame abrupto através do corte repentino na alimentação natural, passando logo para a introdução de *pellets* ou flocos tornando o seu negócio mais rentável (Person, 1989; NOAA, 2016).

## 3.2. Patologia

O conhecimento das patologias mais comuns de uma espécie com interesse comercial, como a *S. senegalensis*, permite ao produtor atuar conforme o seu aparecimento.

### 3.2.1. *Hemibdella soleas*

Ectoparasitas como a *Hemibdella soleas* são sanguessugas que se aproveitam dos progenitores de linguado Senegalês sem apresentarem perigo para os mesmos. Este parasita consegue ser removido quando exposto a baixas concentrações de salinidade (Dinis *et al.*, 1999).

### 3.2.2. Pasteurelose

A Pasteurelose (Pasteurellosis) em peixes é uma doença bacteriana causada pela bactéria *Photobacterium damsela* subsp. *Piscicida*, que provoca elevadas taxas de mortalidade. Os peixes infetados não apresentam lesões externas exceto inchaço abdominal e pigmentação na pele. Por outro lado, expressam palidez no fígado e no rim como também a formação de tubérculos de cor branca (1-2 mm) no baço. Por último, todas as estirpes de *P. damsela* ssp. *Piscicida* demonstravam o mesmo padrão de resistência a medicamentos como a estreptomicina e eritromicina e eram sensíveis a ampicilina, tetraciclina e ácido oxolínico (Imsland *et al.*, 2003).

### 3.2.3. Vibriose

A vibriose em *S. senegalensis* pode ocorrer devido a duas estirpes identificadas como *Vibrio harveyi* e *Vibrio parahaemolyticus*. Esta doença é identificada através do aparecimento de úlceras nos órgãos do indivíduo, sendo na pele mais notório. A inoculação intramuscular de produtos extracelulares (ECP), das duas espécies de *Vibrio*, levou a mortalidades e aparecimento de úlceras na pele. Por outro lado quando os peixes eram submetidos a vacinação com doses subletais de ECP, conseguiu-se reduzir a mortalidade em 32-37% no caso da *V. parahaemolyticus* e 76-83% no caso da *V. harveyi*, quando comparados com peixes não vacinados (Imsland *et al.*, 2003).

### 3.2.4. Tenacibaculose

A tenacibaculose é uma doença bacteriológica ocorrente na espécie *S. senegalensis*, provocando úlceras no animal levando a sua morte. A bactéria gram-negativa que provoca esta doença chama-se *Tenacibaculum maritimum* e é letal, uma vez que o linguado Senegalês tem baixas capacidades bactericidas no muco (local) e no plasma (sistémica), acabando por não ter uma resposta inata à bactéria (Mabrok *et al.*, 2016). Problemas associados a esta epizootia são: elevadas taxas de mortalidade, aumento de suscetibilidade a outros agentes patogénicos e custos elevados no tratamento. Existem tratamentos através da quimioterapia que em aquacultura deixam de ser viáveis, em contrapartida os produtores adotam por estratégias de prevenção através

de banhos de formalina a 40 ppm durante 6h ou o uso de vacinação (Avendaño-Herrera *et al.*, 2006).

### 3.3. Diferentes fases de cultivo

#### 3.3.1. Progenitores

Os progenitores são os indivíduos férteis capazes de iniciarem o ciclo de produção através da produção de gâmetas, seguida da fecundação. Estes são capturados em meio natural e em seguida colocados num ambiente de aclimatização em quarentena. Após este período, os animais dão início a libertação dos gâmetas durante os meses de Abril a Junho (Dinis *et al.*, 1999; Imsland *et al.*, 2003). Este tempo de libertação dos gâmetas pode ser controlado através do fotoperíodo e temperatura, possibilitando a produção de descendência todo o ano (Lenzi and Salvatori, 1989). Os indivíduos demoram cerca de 4 a 6 anos a atingir a maturidade sexual no meio natural e 3 a 4 anos em cativeiro (Dinis *et al.*, 2007)

#### 3.3.2. Incubação

Os ovos fertilizados, após a sua libertação, dão início à fecundação. Este período tem uma duração média de 42H a uma temperatura ótima de 19 °C ( $\pm 800$  Horas-grau a 19 °C). A taxa de sucesso de fertilização pode ser compreendida entre os 50 e 100% (Bedoui, 1995).

#### 3.3.3. Crescimento Larvar

As larvas nascem com um comprimento entre os 2,2 e 2,7 mm e são mantidas a uma temperatura compreendida entre os 19 e 24 °C, nos primeiros 60 dias. A primeira alimentação ocorre aos 3 DAH (dias após nascimento) e o alimento standardizado de produção é artémia dos 3-40 DAH, juntamente com alimento artificial (ração) dos 28 DAH ao final do desenvolvimento do animal (Imsland *et al.*, 2003).



#### 3.3.4. Engorda

A engorda é a última fase de crescimento até a comercialização. Os indivíduos iniciam a fase de engorda aos 125 g de peso, com o objetivo de serem comercializados ao fim de 1 ano. Estes demoram cerca de 1 a 2 anos até atingirem o tamanho comercial, desde o nascimento. São alimentados com ração rica em proteínas (50-55%) e lípidos (12-16%) de fonte animal de modo a maximizar o crescimento (Coutteau *et al.*, 2001). Contudo existem autores que defendem a possibilidade de alimentar estes animais com baixas concentrações em óleos de fonte marinha durante o seu desenvolvimento, exceto antes da sua comercialização onde é introduzida uma dieta rica em óleo de peixe para restabelecer os valores de ácidos gordos do animal (Borges *et al.*, 2014).

## **II. Estágio na maternidade e pré-engorda de *Solea senegalensis*, Safistela, Lda.**

## 1. Introdução à instalação aquícola, Safistela, Lda.

A Safistela, Lda., juntamente com a Aquacria piscícola S.A., pertence ao grupo espanhol Sea8 e são responsáveis pela produção e engorda da espécie *Solea senegalensis* (linguado Senegalês). As instalações de produção de juvenis (Safistela Lda.) encontram-se na Estela, Póvoa de Varzim (figura 6), enquanto o processo de engorda (Aquacria S.A.) ocorre na Torreira, Aveiro.



**Figura 6 - Entrada para as instalações da Safistela, Lda.– Póvoa de Varzim.**

Como primeiro objetivo as instalações foram construídas com o intuito de se produzir *Psetta maxima* (pregado), contudo esta espécie encontra-se já em produção por outras aquiculturas, tanto em Portugal (ex.: Acuinova, em Mira) como noutros países (Espanha, França e Alemanha) (FEAP, 2014), originando dificuldades de mercado. Desta forma, foi opção a reestruturação do espaço, pertencente ao grupo Sea8, de modo a produzir uma espécie com elevado valor comercial e grande procura, tanto no mercado nacional como internacional.

Um dos principais objetivos da empresa Sea8 é ser a maior e principal produtora de Linguado (*S. senegalensis*) na península ibérica e para atingir esse marco é necessário começar por fechar o ciclo de produção da espécie. Através de projetos científicos e colaborações com Universidades, a empresa consegue melhorar as técnicas de produção e com isso aumentar a sua produtividade.

A maior parte dos estudos são realizados na maternidade (Safistela, Lda.), devido ao seu maior acesso a diferentes estados de vida do animal como também a sua própria localização se encontrar perto da Universidade do Porto. Nestas instalações dá-se desde a produção de ovos, durante todo o ano, através da regulação do fotoperíodo e da temperatura dos progenitores, até atingirem a fase juvenil e serem transportados para a Aquacria S.A..

A estruturação da empresa encontra-se dividida em 6 partes: Área dos progenitores, Sala de incubação (ovos), Sala das larvas, Sala do alimento vivo, Área do desmame e Área da pré-engorda.

## 2. As instalações

### 2.1 Área dos progenitores (“broodstock”)

A área dos progenitores ou “broodstock” é normalmente categorizada por uma zona com um grupo de indivíduos, sexualmente maduros, com capacidade de acasalarem entre si originando ovos fecundados. Esses ovos fecundados dão origem a descendência.

O local dos progenitores encontra-se dividido em 4 divisões ou salas, representando as 4 diferentes estações do ano (Inverno, Primavera, Verão e Outono), em que se faz a manipulação do fotoperíodo, temperatura da água e alimentação. Estas manipulações dão origem a diferentes ambientes, simulando as épocas do ano de modo a garantir uma produção contínua de ovos, permitindo à instalação uma continuidade na produção durante todo o ano (Carazo, 2013). É de notar que todas as divisões encontram-se ligadas ao Sistema de Recirculação de água (RAS), exceto a do Verão, que se encontra em sistema contínuo de entrada e saída de água.

Os progenitores são então capturados em meio selvagem ou em sistemas extensivos ou semi-intensivos de produção, fora da época de desova, pois facilita a aclimatização dos animais ao novo ambiente. Ainda assim os animais demoram cerca de 12 meses até que a libertação natural dos ovos ocorra. A fase de quarentena dá-se em tanques quadrados e em sistema contínuo de entrada e saída de água para o ambiente, de modo a prevenir a introdução de doenças no RAS e consequente contaminação da produção. Nesta fase o fotoperíodo e a temperatura não são controlados durante um

período de 6 meses, dentro dos quais são retiradas amostras (para um acesso ao estado de saúde do animal), são feitas marcações (para identificação do animal) e uma passagem gradual de alimento vivo a alimento inerte (passando de poliquetas e moluscos a flocos de ração). Por fim é feita uma diferenciação sexual, identificando tanto os machos como as fêmeas, através de dois processos principais: palpação das gónadas e testes hormonais (Imsland *et al.*, 2003).

Os progenitores são mantidos em tanques quadrados com dimensões superiores a 9m<sup>2</sup> e 80cm de altura de coluna de água. São colocados em grupos com um rácio de 1:1 ou 2:1 de machos/fêmeas, de modo a incentivar a fertilização (figura 7) (Howell *et al.*, 2011).



**Figura 7 - Exemplos de *S. senegalensis* adultos selvagens em tanques quadrados.**

A obtenção de indivíduos selvagens (*wild-stock*) para a reprodução ocorre, porque na Aquicultura ainda não se consegue obter ovos fertilizados suficientes provenientes de descendentes obtidos em cativeiro, que justificasse uma produção sustentável (Dinis and Reis, 1995; Imsland *et al.*, 2003; Guzmán *et al.*, 2008; Morais *et al.*, 2014b).

Estando a fase da aclimatização terminada, os progenitores podem ser transferidos para as respetivas salas de produção. As salas são compostas por 3 a 5 tanques quadrados com um coletor de ovos na saída de água de cada um, de modo a capturar os ovos de uma forma automática e eficaz (Martín *et al.*, 2014).

Quando obtidos os ovos, é feito um teste de fertilização através do teste de flutuabilidade, que consiste na colocação dos ovos num recipiente com água salgada

(32‰) e se estes flutuarem, é sinal que se encontram viáveis. (Dinis, 1992; Neufeld *et al.*, 2011).

Outros fatores, fundamentais para as operações de cultivo, que contribuem para uma maior produtividade e bem-estar animal são: (a) a alimentação, que requer um ótimo manuseamento e gestão, para garantir produtividade à empresa. É administrado alimento vivo juntamente com alimento inerte, sendo este produzido nas instalações de acordo com o protocolo Sea8; (b) a limpeza dos tanques, sendo este um processo crucial para diminuir o risco de aparecimento de agentes patogénicos. Contudo, a limpeza dos tanques deve ser rápida para não causar um aumento do *stress* nos animais e comprometer a produtividade (Volpe *et al.*, 2013; Boison and Turnipseed, 2015; Mondal *et al.*, 2013); (c) A limpeza das salas e equipamento ocorre diariamente no seguimento das rotinas. Ocasionalmente os filtros de areia (correspondentes a esta área) precisam de ser lavados e para isso reverte-se a direção da corrente de água, removendo partículas e descomprimindo o filtro de modo a manter a sua funcionalidade; (d) também importante é a avaliação das condições e comportamento dos animais, que é feita através da observação de modo a causar o mínimo de distúrbio sobre eles (Mondal *et al.*, 2013; Volpe *et al.*, 2013; Boison and Turnipseed, 2015). Neste caso, a altura mais importante para realizar as observações é durante a alimentação e é feita uma avaliação dos indivíduos de modo a garantir que os seus comportamentos são normais para as condições de produção que estão submetidos. A avaliação do animal permite aos responsáveis entender o estado fisiológico do animal e, então, determinar a existência ou não de potenciais agentes patogénicos que possam estar a interferir com o seu desenvolvimento. Adicionalmente, a observação permite identificar se os peixes se encontram em fase de produção de gâmetas, pois é observável nas fêmeas através de um inchaço na zona lateral, onde se encontra o órgão reprodutor; (e) finalmente o controlo dos parâmetros físico-químicos da água, nomeadamente temperatura, salinidade, oxigénio e nitritos.

## 2.2 Sala de incubação

É o local onde se dá a incubação e maturação dos ovos fertilizados.

De modo a iniciar o ciclo de produção é necessário que os reprodutores produzam ovos fertilizados suficientes e que os planos de gestão destes estejam em sintonia com o

resto do ciclo de produção. É importante manter estas duas condições de modo a obter uma produção contínua e ao mesmo tempo salvaguardar o bem-estar animal.

Uma vez verificada a viabilidade dos ovos, estes são transferidos para os respetivos tanques de incubação respeitando a biomassa exigida, sendo esta calculada através do peso dos ovos (segundo protocolo Sea8). Nestas instalações foi adotado um método indireto de incubação, que consiste na separação dos ovos em tanques especializados e individualizados para a sua maturação (FAO, 2015).

Os tanques são cilindro-cónicos (figura 8) para facilitar a remoção de ovos e larvas, pós-eclosão, e serem transportadas para a sala das larvas. Este sistema é composto por uma passagem contínua de água e uma aerificação constante de modo a promover todas as condições necessárias ao desenvolvimento dos animais. Em relação à renovação usada tem de ser de modo a não haver uma acumulação de ovos e larvas no fundo do tanque, pois caso contrário, dificulta todo o processo de alimentação e higiene que estes necessitam (Conceição *et al.*, 2007; Dinis *et al.*, 2007)



**Figura 8 - Sala de incubação – Imagem cedida por Luís Baião.**

Os ovos são incubados com ausência de luz, pois é neste período que a luz tende a ser mais prejudicial para o bom desenvolvimento larvar. Em relação à temperatura, esta tem de ser constante, com valores de 19 °C (Dinis *et al.*, 2007; Cañavate *et al.*, 2006).

O nascimento das larvas ocorre ao fim de 48H, após a incubação e permanecem nestes tanques até aos 2 DAH (“Days after hatching” – Dias após nascimento) sendo logo transferidas para a sala das larvas.

Este processo de transferência das larvas deve ser cuidado e bem executado pois, apesar da robustez das larvas de *S. senegalensis*, este processo é invasivo e prejudicial se for mal executado. O procedimento começa com a remoção das larvas que se encontram na superfície (as larvas são pelágicas até atingirem a metamorfose) e depois através do próprio sistema de remoção de água que o tanque incorpora, é feita a remoção do resto das larvas.

De modo a obter um valor constante de larvas por tanque (na sala das larvas), são feitas transferências homogêneas entre cada tanque, evitando discrepância no número de larvas em cada tanque.

### 2.3 Sala das larvas

As larvas são transferidas da sala de incubação para tanques cilindro-cónicos com fundo cónico e um volume aproximado de 2,7 m<sup>3</sup>/tanque (figura 9 e 10), acabando por diminuir a densidade em cada tanque (Dinis *et al.*, 1999).



Figura 9 - Sala das larvas.



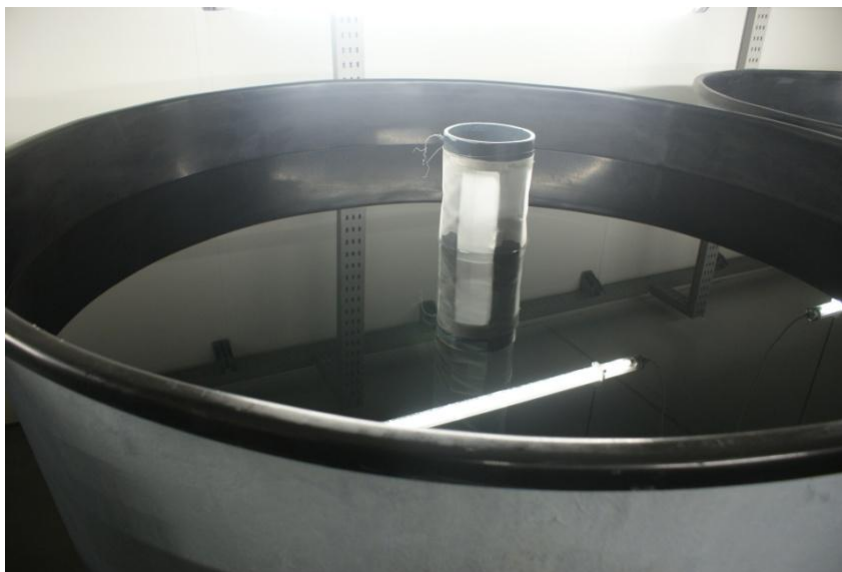


Figura 10 - Exemplo de um tanque de produção larvar.

O fotoperíodo a que estas larvas estão sujeitas é de 8H de ausência de luz e 16H com luz, em que a intensidade é maior nos primeiros dias. A temperatura dos taques varia entre 18 °C e 20 °C e a saturação de oxigénio entre 90% e 100%, com o auxílio de um arejador, permanentemente em operação (Conceição *et al.*, 2007; Dinis *et al.*, 1999; Cañavate *et al.*, 2006) . Existem algumas preocupações em relação ao ambiente de cada tanque devido aos caudais da água e dos arejadores, pois estes interferem com o bom desenvolvimento larvar. Se o arejamento for demasiado forte, acaba por danificar os indivíduos, mas se o contrário ocorrer, irá influenciar o modo como o alimento vivo se comporta, dificultando a interação larva/alimento vivo. Em relação à circulação da água, se esta for elevada irá levar a uma rápida renovação e por isso eliminação do alimento, se o caudal for demasiado reduzido vai levar a uma acumulação de alimento vivo (rotíferos e artêmias), que por sua vez se irão desenvolver nos respetivos tanques, atingindo tamanhos impróprios para consumo, comprometendo todo o ciclo de produção.

No que toca a alimentação, as larvas apresentam comportamentos diurnos e por isso são alimentadas quando as condições da luz são favoráveis. Na primeira etapa são alimentadas com rotíferos e posteriormente com artêmia. Nesta altura é importante a administração de alimento que preencha todas as necessidades larvares. Uma vez que estas dependem da visão para capturar o seu alimento, é fundamental reunirem-se todas as condições ambientais para proporcionar esse efeito. Estas condições ideais acontecem quando se produzem as larvas em meio de águas esverdeadas, promovendo o contraste das presas com o ambiente, como também já foi dito anteriormente, obter um tamanho do alimento propício à abertura de boca das larvas (Villamizar *et al.*, 2011).

Por outro lado a alimentação apresenta também um papel importante nesta fase do desenvolvimento. Se esta for feita de forma correta e proporcionar uma boa evolução no crescimento, então irá ter, por consequência, um efeito positivo na produção. Caso estes requerimentos não sejam estabelecidos, irá trazer mais desafios e complicações à produção, levando a uma quebra do ciclo produtivo. Dito isto, o desenvolvimento larvar deve ser observado diariamente, com recolha de 3 a 6 larvas por tanque e ser feita uma avaliação do comprimento total, conteúdo estomacal e anomalias. Estas amostras são de elevada importância para uma boa gestão da produção, pois é possível avaliar se a ingestão de alimento está a ser feita corretamente (pois a adaptação ao alimento pode ser problemático) e se os tanques apresentam agentes patogénicos no sistema.

Uma outra rotina que se torna essencial nesta fase é a verificação dos parâmetros da água, nomeadamente: temperatura; oxigénio; amónia; nitritos; salinidade e pH. De modo a assegurar os níveis corretos de alguns parâmetros, é feito periodicamente a manutenção dos filtros de areia e limpeza dos filtros U.V.

A limpeza dos tanques é feita de uma forma não invasiva, uma vez que se encontram inseridos num sistema de passagem de corrente de água que elimina os metabolitos e animais mortos através do caudal de entrada e saída de água (o caudal é estipulado pela empresa, de modo a renovar a água sem causar qualquer distúrbio aos animais).

É nesta altura que ocorre a metamorfose das larvas, sendo definido como a rápida mudança morfológica e fisiológica do animal seguido de um período de baixo crescimento. É um processo com uma duração de 15 a 16 dias, após nascimento, a uma temperatura de 19°C. Durante esta fase a larva perde a sua simetria bilateral passando a ser um individuo achatado e assimétrico, devido à migração que o olho esquerdo faz para o lado direito do corpo (Fernández-Díaz *et al.*, 2001).

Quando as larvas realizam a metamorfose (15-16 DAH) estas afundam tornando-se bentónicas. Todo o seu regime alimentar e comportamento muda dando inicio ao processo de transferência das larvas para a zona de desmame. Este processo é semelhante ao da passagem da sala da incubação para a sala das larvas.

## 2.4 Sala do alimento vivo

A maternidade Safistela Lda. está equipada com os meios necessários para a produção de alimento vivo. Uma vez que as larvas da produção se alimentam de presas vivas, maioritariamente, é necessário a produção de alimento vivo que seja adequado ao estado e tamanho dos indivíduos. Por isso a produção deste alimento vivo encontra-se sincronizado com a produção e evolução das larvas de *S. senegalensis*. A alimentação é dada manualmente e a preparação do alimento vivo enriquecido é feita de manhã para ser dada o resto do dia. Este enriquecimento é feito à base de óleos ricos em PUFA, também conhecidos como ácidos gordos omega-3, para garantir um bom desenvolvimento larvar e assegurar boas taxas de sobrevivência (FAO, 2015). A área de produção do alimento vivo encontra-se dividida em duas partes, sendo uma focada apenas para a produção de artémia e a outra para a produção de rotíferos.

## 2.5 Sala dos rotíferos

Os rotíferos são animais aquáticos e microscópicos e são produzidos em tanques cilíndricos de 1 m<sup>3</sup> com fundo cónico, para facilitar todas as operações de maneo (figura 11). São mantidos a uma temperatura de 28 °C, uma saturação de oxigénio a 80% e uma salinidade idêntica à dos peixes da produção. O oxigénio é fornecido através de difusores de ar, que mantém a sua distribuição e a do seu alimento, homogénea. O sistema de produção de rotíferos usado é o de cultura descontínua. Este tipo de cultura consiste em sistemas fechados de alta produção, em ambientes controlados, de modo a otimizar o crescimento. Isto inclui sistemas de alta produção em pequenos ciclos (3 dias) em tanques de 1m<sup>3</sup>, começando com 10.000 ml<sup>-1</sup> rotíferos e acabando com 30.000 ml<sup>-1</sup> (Dhert and Sorgeloos, 1995).



Figura 11 - Tanque de produção de rotíferos.

A alimentação dos rotíferos consiste em algas e leveduras, administrado várias vezes ao longo do dia. Uma vez atingido o tamanho necessário para alimentar as larvas, os rotíferos são enriquecidos com uma forma comercial (protocolo Sea8), que contém altos valores de ácidos gordos (EFA) (Lavens and Sorgeloos, 1996)

Rotineiramente é necessário manter o ciclo de produção destes rotíferos, através: (a) do controlo dos níveis de oxigénio a cada 4H; (b) limpeza do equipamento e da sala, de modo a fazer uma desinfeção completa, pois os rotíferos são afetados por bactérias e parasitas, sendo uma prioridade prevenir o aparecimento destes agentes patogénicos (Mondal *et al.*, 2013; Volpe *et al.*, 2013; Boison and Turnipseed, 2015); (c) é necessário uma recolha de dados diária sobre a biomassa, através da colheita de amostras e fazer a contagem, estimando a população existente no tanque; quando os rotíferos atingem os 3 DAH, é necessário fazer a sua colheita por filtração e enriquecê-los; (d) Uma vez enriquecidos são depois armazenados num local fresco de modo a baixar o metabolismo para não se perderem propriedades durante a metabolização.

## 2.6 Sala das artémias

As artémias são pequenos crustáceos com propriedades únicas e cores e tamanhos variados, sendo o alimento mais usado para alimentar larvas de variadas espécies de peixe.

A produção deste crustáceo é feita em circunstâncias idênticas às dos rotíferos. São criados em tanques cilíndricos com fundos cônicos e o oxigénio é administrado através das mesmas tubagens que nos rotíferos, tentando manter uma saturação de 80% (figura 12). Tanto a salinidade como a temperatura são idênticas à dos rotíferos, contudo existem algumas diferenças, nomeadamente no pH. Para manter um pH estável a um nível adequado (pH=8), é administrado hidróxido de sódio (NaOH), para impedir que o nível de pH desça, ao ponto de ser desfavorável ao desenvolvimento da artémia (Lavens and Sorgeloos, 1996)



**Figura 12 - Tanque cilindro-cônico usado na produção de artémia.**

A eclosão da artémia ocorre ao fim de 24H de incubação (Lavens and Sorgeloos, 1996) e para separar os cistos dos crustáceos, é feita a passagem de água por um sistema de filtração capaz de remover os cistos por magnetismo. Este processo de remoção de cistos é possível porque estes foram submetidos a uma técnica que insere partículas de ferro na capsula (cisto), logo permite a sua remoção (Naessens *et al.*, 1995).

Uma vez que a filtração esteja completa, a artémia é colocada noutra tanque onde se processa o seu desenvolvimento até atingir o tamanho necessário para alimentar as larvas. Aquando a preparação da artémia para alimentar as larvas, estes pequenos crustáceos são submetidos a um enriquecimento com uma fórmula comercial (de acordo

com o protocolo da Sea8), rico em ácidos gordos (HUFA) (Lavens *et al.*, 1995). Esta fase de enriquecimento é fundamental para o aumento da estrutura nutricional das artémias e, assim, satisfazer as necessidades nutricionais das larvas de Linguado.

Em relação às rotinas da produção de artémias, estes são semelhantes à dos rotíferos: é necessário o controlo do nível de oxigénio a cada quatro horas; limpeza e desinfeção das salas de produção para prevenir o desenvolvimento de agentes patogénicos; separação dos cistos da artémia através da técnica previamente mencionada; conservar a artémia recentemente enriquecida num local fresco (figura 13), de modo a baixar o metabolismo e evitar a perda de propriedades através dos processos metabólicos.



Figura 13 - Leiteira usada para conservar artémia enriquecida.

## 2.7 Área do Desmame

Esta zona da produção é a que possui maior área com 49 tanques quadrados (figura 14) e um pequeno laboratório, onde são feitas todas as análises necessárias à aquicultura. A área onde estão implementados os tanques encontra-se dividida em duas partes, nomeadamente, desmame 1 e desmame 2.





Figura 14 - Zona de desmame na Safistela Lda. - imagem cedida por Luís Baião.

A grande diferença entre estas duas divisões é que o desmame 2 encontra-se inserido no sistema de recirculação da aquicultura, enquanto o desmame 1 encontra-se em sistema contínuo de entrada e saída de água.

A transferência das larvas, da sala das larvas, é feita para o desmame 1 de modo a garantir a não-passagem de patogénicos para o sistema de recirculação e vice-versa.

O nome “área do desmame” é dado porque é nesta fase que as larvas começam a alimentar-se com alimento inerte (*pellets*) enquanto o alimento vivo é reduzido gradualmente. Este processo ocorre entre os 25 e os 30 DAH, sendo uma fase crucial para o ciclo de produção, visto que a ausência de adaptação ao alimento inerte, irá fazer com que as larvas necessitem de mais alimento vivo e por isso aumentar os custos de produção e reduzir o seu crescimento (Dinis *et al.*, 1999).

As rotinas diárias, respetivas à área do desmame, tem de ser executadas de uma forma rápida e cuidadosa, para diminuir o tempo de interação com os peixes, de modo a garantir o bem-estar animal. As rotinas dividem-se em: analisar os parâmetros da água, limpeza e desinfeção dos tanques, alimentação e avaliação geral dos tanques. A análise da água é feita ao oxigénio, a temperatura, bromo, amónia, salinidade, nitritos, ph, o potencial de oxidação-redução e a transmitância a  $\lambda 400$  e a  $\lambda 500$  (através de um espectrofotómetro). A temperatura é vista, na entrada de água de um tanque, com um termómetro. O oxigénio é medido com um oxímetro, em todos os tanques, junto da saída de água onde os valores são menores. Os limites de cada parâmetro são calculados de

acordo com o protocolo Sea8. A limpeza e desinfecção do equipamento usado, sendo esta parte fulcral na existência de um ambiente estéril (Mondal *et al.*, 2013; Imsland *et al.*, 2003), ocorrem através da limpeza diária dos tanques com uma escova, de modo a limpar os detritos acumulados, como também observar a existência de peixes mortos. A alimentação é um processo mecânico porque nesta área existem alimentadores em cada tanque, que se encontram ligados a um silo mecânico programado para enviar ração, previamente calculada (o peso), consoante a biomassa de cada tanque, respetivamente. Os tanques com necessidade de alimento vivo são administrados manualmente. Por último a avaliação geral da condição dos peixes nos tanques é feita através da observação dos tanques enquanto se faz a limpeza total. Todos os animais doentes ou danificados de alguma forma, são removidos e registados no sistema informático. Todos os tanques cujos valores de mortalidade/peixes danificados seja elevado, são tratados de acordo com o protocolo Sea8.

Por outro lado existem operações que têm de ser feitas periodicamente tal como a triagem que consiste na separação dos peixes por tamanho, onde ao mesmo tempo é feita uma avaliação da saúde dos animais, visto que esta espécie apresenta uma grande disparidade de tamanhos com a mesma idade (Imsland *et al.*, 2003; Blonk *et al.*, 2010; Overton *et al.*, 2010). Esta operação é feita manualmente com a ajuda de instrumentos de triagem, que tem uma rede que permite a passagem dos peixes de menor tamanho, sendo estes depois descartados. É feita também uma estimativa da biomassa por tanque, que consiste na pesagem de 100 peixes e calcular o peso médio. Em seguida, quando os peixes, já calibrados, estão a voltar para o tanque é feita uma pesagem, depois soma-se todas as pesagens para saber o peso total do tanque e com esse valor calcular (um valor estimado) o número total de indivíduos. Quando obtido o valor do total de indivíduos multiplica-se pelo peso médio e obtém-se a biomassa. Por último existe a transferência dos peixes da área do desmame para a área da pré-engorda. Este processo tem de ser executado da melhor forma, para diminuir os riscos de contaminação da pré-engorda. Quando se agenda estas transferências, todos os outros processos são feitos de uma forma mais rápida e eficiente possível, sem comprometer o bem-estar animal. A transferência é feita quando os animais atingem o tamanho estipulado pela Sea8.



## 2.8 Área da Pré-Engorda

A área da pré-engorda é caracterizado por ser o espaço onde os animais atingem o peso e tamanho necessário para serem enviados para a Aquacria (Aveiro), onde serão realojados num espaço que permitirá o seu desenvolvimento até atingirem o tamanho pretendido para venda/consumo.

A pré-engorda é constituída por 56 tanques (raceways), divididos em 4 patamares, onde cada patamar está dividido em lado Norte e Sul, com 7 tanques de cada lado (figura15).

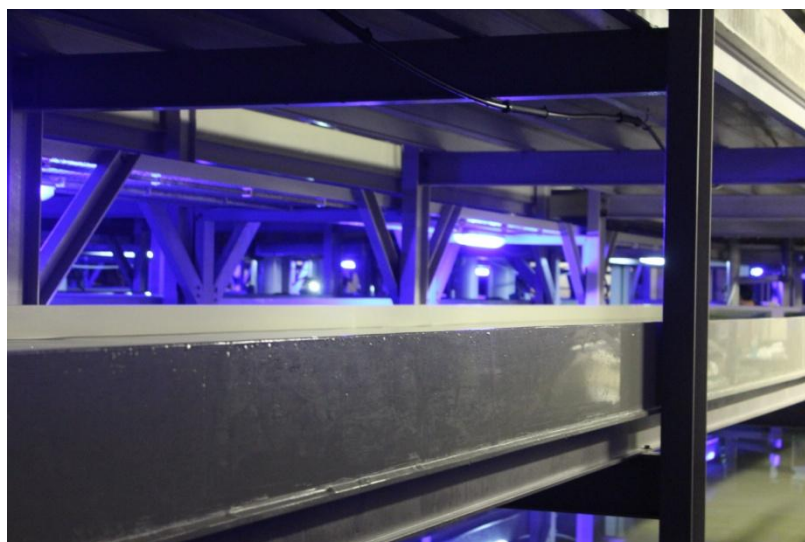


Figura 15 - Raceways da zona da pré-engorda, Safistela, Lda.

Tal como já foi mencionado, os peixes provém da zona de desmame e irão permanecer nesta área até atingirem as 40g de peso e depois transferidos para a unidade de engorda (Aquacria Piscícolas S.A.) localizada em Estarreja, Aveiro.

Todos os processos ocorrentes nesta área são semelhantes aos da área de desmame. No que toca a rotinas diárias, estas são idênticas (análise dos parâmetros da água, limpeza dos tanques, alimentação e avaliação das condições dos peixes) com a exceção do espaço ser maior nesta zona e ser necessária uma maior quantidade de alimento, devido ao aumento da biomassa por tanque.

Os peixes são mantidos com temperaturas entre os 18 °C e 20 °C, salinidade entre os 30-35‰ e oxigénio acima dos 80% de saturação (Ambrosio *et al.*, 2008; Palazzi *et al.*, 2006).

Na pré-engorda faz-se a graduação e diferenciação dos peixes por tamanhos (tal como no desmame) e é feito através de um calibrador automático que diferencia entre tamanhos pequenos, médios e grande. Todos os peixes de pequenas dimensões são descartados, devido a sua baixa capacidade de crescimento quando comparados com peixes de maiores dimensões e com a mesma idade.

Em último lugar existe o transporte de uma instalação (pré-engorda) para outra (engorda). O plano de gestão de transporte requer que os peixes passem por uma fase de jejum (24-48H), fazendo com que a produção de matéria orgânica seja diminuta e com isso ajudar a prevenir a deterioração da água durante o transporte. Este processo é feito uma vez em cada mês, através de um meio de transporte capacitado para transportar peixe vivo e em elevadas quantidades. No dia do transporte todo o processo deve ser feito de forma eficiente e rápida, sem prejudicar os animais, de modo a não comprometer o bem-estar animal. A distribuição dos peixes é feita de igual forma entre tanques do veículo de transporte, de modo a garantir uma biomassa constante e estável (Lekang, 2013).

## 2.9 Sistema de Recirculação de Água em Aquacultura (RAS)

A implementação de um sistema de recirculação numa instalação como a Safistela é a melhor opção, pois trata-se de uma produção intensiva de peixe e deste modo é possível fazer uma renovação da água em circulação e diminuir o risco de aparecimento de agentes patogénicos. Nesta produção é usado o sistema de recirculação (RAS), tal como o de passagem de corrente.

A contaminação proveniente do ambiente representa uma das maiores ameaças para a produção animal, incluindo a aquicultura. Deste modo foi necessário a criação de um sistema capaz de renovar a água sem que seja necessário a captação de água exterior.

O sistema de RAS é considerado o mais ecológico e eficiente sistema de tratamento de água para esta atividade (Zhang *et al.*, 2011). Este sistema ajuda no controlo dos parâmetros da água, promovendo assim uma maior estabilidade físico-

química, como também regula parâmetros que as condições climatéricas possam alterar e assim melhorar as condições e promover o bem-estar animal (Dalsgaard *et al.*, 2013).

Em alguns países desenvolvidos a produção aquícola encontra-se estagnada devido á competição existente no mercado. Uma das formas de combater esta tendência é apostando em tecnologias capazes de aumentar e melhorar a produção de uma aquicultura, sendo uma dessas tecnologias o sistema de RAS, que aumenta a produtividade quando comparado com outros sistemas (Zhang *et al.*, 2011; Badiola *et al.*, 2012; Rabassó and Hernández, 2015).

O sistema de RAS foi criado e desenvolvido com o intuito de aumentar a eficiência e diminuir os impactos negativos numa aquicultura. Para atingir estes objetivos é necessário que faça o tratamento da água e reutilize a maior parte dela, de modo a diminuir a necessidade de recorrer a captação de água do ambiente. Este tratamento terá de realizar processos mecânicos, biológicos e químicos para manter os parâmetros da água adequados ao animal em produção.

### 2.9.1 Objetivo de um Sistema RAS

Qualquer sistema aquícola tem de ter em consideração a manutenção da qualidade da água a níveis ótimos para a produção, níveis esses que são influenciados por metabolitos e partículas de ração não consumidas. Estes componentes são maioritariamente matéria orgânica em partículas (POM), matéria orgânica dissolvida (DOM), compostos azotados e fósforo.

O sistema RAS veio permitir a produção intensiva de peixe, através da diminuição da captação de água e libertação de água para o exterior, conseguindo reutilizar ao máximo a água dentro da aquicultura. Contudo este sistema apresenta algumas desvantagens, tais como: dificuldade no tratamento de doenças; gestão do sistema; alto custo de implementação.

### 2.9.2 Sistema RAS na Safistela Lda.

O sistema RAS nesta instalação encontra-se dividido em duas partes, uma focada no tratamento de água vinda da pré-engorda e outra focada no tratamento das águas provenientes da zona de desmame e dos progenitores.

Cada parte é constituída por filtros biológicos e mecânicos, um escumador, termostatos, sistema de ozonização e filtros UV. Existem também bombas de água responsáveis pela distribuição da água no sistema de circulação das instalações, tendo cada parte bombas de reserva de modo a garantir a continuidade da produção numa eventual falha.

No que toca a Safistela Lda., existem procedimentos que permitem o funcionamento correto e promovem a longevidade do sistema RAS, tais como: avaliar os níveis da água nos filtros; verificar o caudal do escumador; verificar se o sistema de ozonização se encontra em funcionamento; controlar os valores de oxidação-redução; verificar a existência de colmatção nos filtros mecânicos; fazer uma limpeza dos filtros de UV de modo a garantir a sua máxima potencialidade na eliminação de microalgas e outros microrganismos.

### 3. Rotinas diárias na empresa Safistela, Lda.

O estágio teve a duração de 8 meses (Outubro de 2014 – Maio 2015) que foi repartido entre as 4 partes que fazem parte da constituição da instalação, nomeadamente: área dos progenitores (1 mês); salas do alimento vivo (1 mês); área do desmame (4 meses); área da pré-engorda (2 meses). Os responsáveis são distribuídos de modo a garantir uma boa manutenção em cada espaço. Contudo a descrição de um dia de trabalho irá ser feita nos espaços onde seja necessária atenção diária e permanente dos trabalhadores.

#### 3.1 Área do desmame

Nesta área, como já foi referido anteriormente, existem 3 partes (desmame 1, desmame 2 e laboratório). O “desmame 1” recebe os peixes vindos da sala das larvas e é necessário proceder com a administração de alimento vivo nos respetivos tanques, até estes atingirem tamanho suficiente e ser iniciado o processo de desmame. Nos tanques onde é apenas administrado alimento vivo, não se executam rotinas de limpeza nem avaliação do estado dos peixes, pois estes encontram-se numa fase de vida bastante frágil e por isso não são feitas rotinas. Contudo são feitas rotinas diárias nos restantes tanques. O processo de desmame consiste na passagem de alimento vivo para alimento inerte (*pellets*), com o objetivo dos indivíduos passarem a ser alimentados apenas com alimento inerte. Uma vez estabelecida essa passagem, os indivíduos são transferidos para o “desmame 2”.

Cronologicamente as rotinas são:

- 1º - É feita uma avaliação do sistema de recirculação de água (filtros, nível da água no escumador, bombas de água, termostatos e geradores de ozono);
- 2º - Se existirem larvas na sala das larvas, é feita uma recolha e uma avaliação do tamanho;
- 3º - É feita uma limpeza e avaliação dos peixes (durante este processo é necessário remover qualquer indivíduo danificado ou doente e registar no quadro geral, para serem depois colocados os dados numa base de dados informática da empresa);

4º - É feita uma análise dos parâmetros da água, desde saturação de oxigénio e temperatura, a valores de oxidação-redução, amónia e nitritos;

5º - Existem outras tarefas que são feitas periodicamente, como a triagem e posterior distribuição dos peixes, avaliação da biomassa de cada tanque, transferência dos animais para a zona da pré-engorda, aplicar tratamento nos tanques que exigem necessidade e limpeza e desinfecção da área de desmame.

Dada a dispersão de idades entre os peixes, a graduação e seleção dos peixes é uma prática comum, enquanto a estimativa da biomassa e a transferência para a área da pré-engorda são feitas periodicamente (de acordo com os protocolos Sea8).

A limpeza e desinfecção são feitas diariamente. Contudo existem umas tarefas mínimas que necessitam de ser feitas de modo a garantir que o protocolo de biossegurança seja mantido: verificação do sistema RAS e os seus componentes; registo dos dados na base informática da Safistela, Lda..

### 3.2 Salas do alimento vivo

Como já foi dito anteriormente, esta zona da produção é constituída por duas salas, uma para a produção de artémia e outra para a produção de rotíferos. A produção destes animais tem de ser feita continuamente, durante o ano, pois na área de desmame existem larvas com a necessidade de se alimentarem de presas vivas, até passarem a ser alimentadas com apenas alimento inerte (segundo protocolo Sea8).

Nesta área as rotinas são feitas em simultâneo, tanto a produção e desenvolvimento das artémias como dos rotíferos. A produção de artémia requer os seguintes passos: em primeiro lugar é necessário garantir que as larvas recebam alimento ao início do dia (manhã), daí ser necessário a filtração de artémias, previamente enriquecidas e guardadas num recipiente fresco (numa leiteira), e prosseguir com a sua administração; em seguida faz-se uma estimativa da quantidade de cistos de artémia necessária para as 48H seguintes; em terceiro lugar, nas artémias que necessitam de enriquecimento é acrescentado hidróxido de sódio. Sempre que é adicionado hidróxido de sódio é necessário registar; Como quarta tarefa é feito o cálculo da biomassa existente em cada tanque, de artémia já eclodida, através da contagem do nº de indivíduos existente em 1ml de água. Uma vez obtido este resultado prossegue-se com o cálculo do volume necessário de artémia que vai ser administrado aos alevins (de acordo

com o protocolo da Sea8); Por último é feita uma limpeza e desinfeção da área de trabalho.

No que diz respeito às rotinas relacionadas com os rotíferos, são: começa-se por colocar os rotíferos, previamente enriquecidos, num sistema de filtração para depois serem fornecidas às larvas; em seguida inicia-se a produção de uma nova cultura, num tanque previamente limpo e desinfetado (de acordo com o protocolo Sea8); em terceiro lugar é feita a contagem, como nas artémias, do número de indivíduos em 100µl, de modo a calcular a biomassa existente no tanque. Com o valor da biomassa obtido é feito, em seguida, o cálculo do volume de rotíferos que vai ser dado às larvas (valores de acordo com o protocolo Sea8); por último é feita a limpeza e desinfeção da área de trabalho.

### 3.3 Área dos Reprodutores

As rotinas diárias ligadas aos reprodutores conseguem ser as mais simples e são executadas de forma rápida e eficiente sem perturbar os animais.

O responsável encarregado pelos reprodutores tem de:

- 1º - Verificar o sistema RAS ligado a esta área, se encontra em correto funcionamento;
- 2º - Deve avaliar o estado dos animais (presença de anomalias ou doenças) e verificar a existência de ovos nos coletores respetivos;
- 3º - Deve ser feita uma limpeza dos tanques e dos coletores, enquanto a limpeza ocorre deve-se verificar o estado dos animais e se encontram a produzir gâmetas (visível através de um inchaço na parte dorsal das fêmeas);
- 4º - É feita uma limpeza e desinfeção do espaço de acordo com o protocolo de biossegurança; depois verifica-se o sistema de circulação de modo a garantir que este funciona dentro das condições estabelecidas;
- 5º - São feitos registos numa base de dados, sobre eventuais mortalidades e dos parâmetros físico-químicos.

O manejo e gestão da zona dos reprodutores permite manipular os animais para obter nascimento e produção de larvas durante todo o ano. Isto é possível através da manipulação da temperatura que controla o ciclo de reprodução destes animais.

### 3.4 Área da pré-engorda

As rotinas diárias referentes a esta área são estabelecidas em todos os quatro andares que nela existem e por isso o processo é mais lento.

As rotinas da área da pré-engorda consistem em:

- 1º - Inspeção do sistema de RAS, semelhante ao da área de desmame;
- 2º - É feita uma limpeza de todos os tanques, verificando a existência de peixes danificados ou mortos e em seguida retirá-los e fazer o seu respetivo registo;
- 3º - Se necessário fazer uma triagem e separação dos peixes;
- 4º - Fazem-se análises à água, de modo a controlar os parâmetros físico-químicos desta, para reduzir o stress provocado nos animais;
- 5º - Limpeza e desinfeção da área de trabalho; fazer tratamento (de acordo com o protocolo Sea8) dos tanques com surtos de doenças (se existirem);
- 6º - Nos dias de transporte para a Aquacria (instalação de engorda, em Aveiro) são feitas todas as preparações necessárias, desde organização do *staff* até ao carregamento dos animais para o meio de transporte;
- 7º - Se necessário, fazer as respetivas preparações para receber peixes vindos da zona de desmame.

Devido às dimensões dos pexes e diferenças de tamanho são feitas, regularmente, calibrações e seleções dos peixes, para obter tanques mais homogéneos. Esta operação na área da pré-engorda tem um tempo de duração mais longo que na área de desmame e são necessários mais elementos de trabalho para o executar. É durante esta operação que se faz a separação dos peixes por tamanhos e remove-se os de crescimento lento, danificados ou com doenças.

No que corresponde às análises físico-químicas da água, é verificado a saturação de oxigénio, temperatura, reação oxidação-redução, nitritos e amónia de cada tanque.

Conclui-se com uma limpeza e desinfeção geral do espaço, de modo a garantir os níveis sanitários exigidos pela Sea8.



### **III. Otimização de dietas de desmame de *Solea senegalensis* em condições de produção.**

## 1. Objetivo do ensaio

Complementou-se o estágio na maternidade da Safistela com um trabalho científico de importância significativa para a empresa. O objetivo desse ensaio foi testar diferentes formulações de dietas, com a ideia de efetuar a transição de alimento vivo para alimento inerte (desmame) em pós-larvas de linguado Senegalês. Desta forma foram usadas várias formas e estratégias para obter um desmame otimizado em linguado. Estratégias estas que incluíram a utilização de dietas com elevados níveis de hidrolisados proteicos, que permitiram fornecer uma elevada atração aos alimentos durante os primeiros dias de alimentação. Em seguida foram administradas dietas com proteínas e lípidos de origem animal e vegetal, de modo a analisar e verificar a preferência alimentar do animal em situação de desmame, como também a sua performance no crescimento e sobrevivência consoante as diferentes condições alimentares. No final do ensaio determinou-se quais as dietas com maior eficiência em termos de sobrevivência, crescimento e desempenho global do Linguado, em condições reais de produção.

O ensaio realizou-se nas instalações da maternidade Safistela Lda., na Póvoa de Varzim, pertencente ao grupo Sea8®, com o objetivo de aprender métodos necessários à realização de um ensaio zootécnico com larvas de linguado Senegalês, incluindo manutenção de sistemas de cultivo e todo o processo analítico correspondente para a avaliação dos resultados do desempenho dos animais em diferentes condições alimentares.

## 2. Materiais e métodos

### 2.1 Procedimento experimental

O ensaio desenvolveu-se com o objetivo de comparar 5 dietas diferentes, uma das quais a controlo, nas quais variaram os valores de introdução de lípidos e proteínas de diferentes fontes vegetais e animais. É de realçar que não foi dada toda a informação acerca das fontes e composições das dietas, uma vez que se tratava de um projeto empresarial. O ensaio ocorreu entre 31 DAH e 70 DAH, em larvas de linguado na fase de desmame.

O processo experimental decorreu entre os dias 03 de Novembro e 11 de Dezembro de 2014, sendo o seu tempo de duração de 39 dias. As larvas foram introduzidas nos tanques experimentais ao 29 DAH (01 de Novembro), para sofrerem uma aclimatização ao sistema. Esta aclimatização teve a duração de 2 dias, com o objetivo de reduzir o *stress* e ambientar os animais, de modo a reduzir o aparecimento de doenças (Boeuf, 2009). O sistema experimental era constituído por 15 tanques com 20 litros de capacidade de água (figura 16), onde a coluna de água rondava os 20cm de altura e um sistema de escoamento (esgoto) (figura 17). A circulação de água provinha da zona de desmame da instalação, mantendo-se em circuito aberto com um caudal de 20L/H até ao 5º dia de ensaio, onde passou a ser 40L/H.



Figura 16 - Sistema de produção criado para o ensaio experimental.



Figura 17 - Tanque usado no ensaio demonstrando a coluna de água e o sistema de esgoto.

A alimentação foi dada através de um alimentador automático de banda, constituído por um relógio mecânico e um tapete. O alimentador e a ração foram colocados de forma a administrar alimento durante 18 horas, em formato semi-contínuo (figura 18).

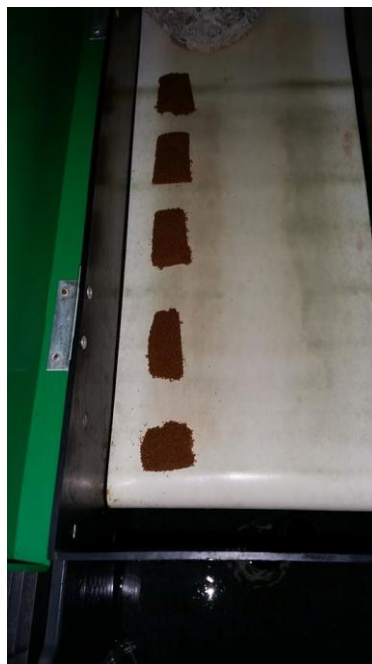


Figura 18 - Alimentador automático com a ração distribuída a ser administrada durante 18 horas, em formato semi-contínuo.

O início do ensaio deu-se aos 31 DAH mas as larvas foram transferidas, previamente, no 29DAH, de modo a ocorrer a aclimatização. As larvas foram retiradas todas do mesmo lote inicial e distribuídas pelos 15 tanques da experiência. A densidade de cada tanque foi estimada pelo peso médio das larvas, com o objetivo de obter cerca de 1000 larvas por tanque. Optou-se por fazer a transferência de todas as larvas em caixas com água do sistema de modo a minimizar o *stress* provocado aos animais, uma vez se fossem transferidas individualmente poderia comprometer o ensaio.

As larvas começaram por ser alimentadas com artémia no dia 29 DAH até às 19h00 de dia 30 DAH, de acordo com o protocolo de alimentação da empresa. Os indivíduos sofreram jejum até a manhã de dia 31 DAH, como o procedimento empresarial implica, sendo necessário para a introdução da ração inerte.

### 2.1.1. Dietas e Alimentação

Ao dia 31 DAH iniciou-se o ensaio experimental através da introdução das 5 dietas experimentais, previamente programadas, em triplicado. As dietas (Tabela 1) estão descritas da seguinte forma: Aglonorse (Aglo) + Gemma Diamond (Gem), G + A, G + CN, G4 e G1\_V2. A ração controlo era a Aglo+Gem e era usada pela empresa que se dividia entre Aglonorse, usada até ao dia 45 DAH, e Gemma Diamond desde 45 DAH até 70 DAH e foi aplicada nos tanques 1, 11 e 15. A G+A era constituída pela dieta G rica em hidrolisados proteicos (proteínas mais solúveis que serve como atração inicial à ração), que por sua vez era administrada na primeira semana, e pela dieta A que era rica em EFA de origem marinha, administrada no final da primeira semana até ao fim do ensaio. Esta dieta foi aplicada nos tanques 3, 7 e 12. A G+CN era constituída pela dieta G, na primeira semana, e pela dieta CN que continha EFA de fontes de tanto animais como vegetais. Esta dieta foi aplicada nos tanques 4, 10 e 13. A G4 era constituída por proteína de origem vegetal e animal. Esta dieta foi aplicada nos tanques 5, 8 e 14. Para finalizar, a dieta G1\_V2 era constituída por baixos valores de hidrolisados proteicos e uma constituição de proteína de origem vegetal. Esta dieta foi aplicada nos tanques 2, 6 e 9.

A quantidade de ração administrada aos indivíduos de cada tanque foi estipulada pelo protocolo da empresa, com o objetivo de igualizar o procedimento ocorrente na zona de desmame da maternidade. Contudo quando verificada alguma agitação em redor do tanque, por parte dos peixes, era administrada ração adicional.

**Tabela 1 - Protocolo dos tratamentos experimentais\***

Dieta	Tanques	Método de administração
Aglonorse+Gemma Diamond	1, 11 e 15	Aglonorse – 31DAH até 44DAH Gemma Diamond – 45DAH até 70DAH
G + A	3, 7 e 12	G – 31DAH até 37DAH A – 38DAH até 70DAH
G + CN	4, 10 e 13	G – 31DAH até 37DAH CN – 38DAH até 70DAH
G4	5, 8 e 14	G4 – 31DAH até 70DAH
G1_V2	2, 6 e 9	G1_V2 – 31DAH até 70DAH

\*31DAH corresponde ao primeiro dia e 70DAH ao último dia do ensaio.

O ensaio encontrava-se integrado num projeto com a empresa Sparos® Lda, que não forneceu informações acerca da origem das dietas devido ao sigilo empresarial. Contudo foi possível ter acesso a informação com os valores aproximados da composição de cada ração (tabela 2).

**Tabela 2 - composição das dietas experimentais.**

Dieta	% DM	Ash (%DM)	Protein (%DM)	Fat (%DM)	Energy (kJ/g) - %DM	P(%DM)
G	92,01	12,47	67,82	20,20	23,28	1,92
CN	92,80	12,86	66,76	18,97	22,71	2,16
G4	93,23	13,35	67,33	15,91	22,96	2,17
G1_V2	91,30	15,14	64,51	19,05	23,15	2,04
A	91,12	11,15	67,41	17,03	22,67	2,19

## 2.2 Amostragem

Foram feitas 3 amostragens durante o procedimento experimental. A primeira ocorreu no dia 0 (31 DAH) de ensaio, antes das larvas serem alimentadas com as dietas. Foram retiradas apenas 0,3% das larvas por tanque porque estas pertenciam todas ao mesmo grupo inicial. A segunda e terceira amostragem ocorreram ao dia 14 (45 DAH) e dia 39 (70 DAH) de ensaio, respetivamente, tendo sido retiradas 3% das larvas por tanque.

As amostragens seguiram-se de identificação, fotografia e congelamento individual a -18 °C. As fotografias permitiram fazer a medição do comprimento total das larvas através do uso do programa *Axion Vision Rel. 4.8.®*. Após congelamento as larvas sofreram o processo de liofilização para posterior medição do peso seco.

## 2.3 Manutenção

A manutenção do sistema era feita diariamente através da limpeza dos tanques, verificação de mortalidades ou potenciais patologias existentes e preparação das dietas. Todos os indivíduos que apresentassem anomalias ou estivessem mortos, eram retirados de imediato. No final da rotina de limpeza ao sistema dava-se início a preparação das dietas, através da pesagem e posterior colocação nos alimentadores automáticos.

No que respeita aos fatores físico-químicos das condições gerais de produção do sistema, a temperatura média foi de 20°C e oxigénio dissolvido de 9,7±1 mg/L. Estes valores foram obtidos através de medições diárias ao sistema.

Por último foi feita a contagem dos indivíduos existentes em cada tanque. Deste modo foi possível obter o valor exato do número de peixes existente em cada tanque, sem comprometer o ensaio nem o bem-estar dos animais

## 2.4 Análise estatística

Todos os dados foram sujeitos a uma análise de modo a obter a média, o desvio padrão e coeficiente de variação. Os dados foram também submetidos a uma análise

ANOVA (variância a um fator) juntamente com os testes de normalidade e homogeneidade. Todas as diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ . As diferenças significativas foram calculadas através do teste ANOVA (5 variâncias) e uma vez obtidas, diferenças significativas entre as médias, foi feito o teste Tukey (teste de comparação de médias). Todos os processos estatísticos foram feitos através do software SPSS v23.

### **Taxa de crescimento relativo (RGR)**

A taxa de crescimento relativo foi calculada como a mudança de peso dos indivíduos e expressa em percentagem do peso médio final (Otubusin *et al.*, 2009).

$$RGR = (eg - 1) \times 100 \text{ (em que } g = [\ln(\text{peso final}) - \ln(\text{peso inicial}) \times \text{tempo} - 1])$$

### **Peso Total**

O peso total foi calculado através do peso seco e assumindo que as larvas eram constituídas por 80% de água)

$$\text{Peso Total} = \text{Peso Seco} / 0,2$$

### **Taxa de sobrevivência (SR)**

A taxa de sobrevivência é o número, expresso em percentagem, de peixes que sobrevive durante o período experimental, tendo em conta o número total inicial de indivíduos (Charo-Karisa *et al.*, 2006).

$$SR = 100 - (\text{Mortalidade} / \text{número de peixes inicial} \times 100)$$

### **Taxa de conversão alimentar**

A taxa de conversão alimentar é a quantidade ração necessária para fazer aumentar a biomassa do/s indivíduo/s

$$FCR = \text{alimento ingerido (g)} / \text{aumento da biomassa (AB) (g)}$$

$$AB = \text{número de larvas totais} \times \Delta \text{ peso total (peso final} - \text{peso inicial)}$$



Por último, as variáveis onde a homogeneidade de variâncias não foi verificada sofreram uma transformação da seguinte forma:

**Transformação logarítmica (TI)** – usada para valores inteiros

$TI = \ln(\text{valor a transformar})$ ;

$TI = 1 - \ln(\text{valor a transformar})$ , quando o valor é inferior a 0.

**Transformação de uma percentagem (Tp)** – usada para valores percentuais

$Tp = \text{ASEN}(\text{RAIZQ}(\text{valor a transformar} / 100))$

ASEN = Arco do seno

RAIZQ = Raíz quadrada

### 3. Resultados

#### 3.1 Peso seco e comprimento total

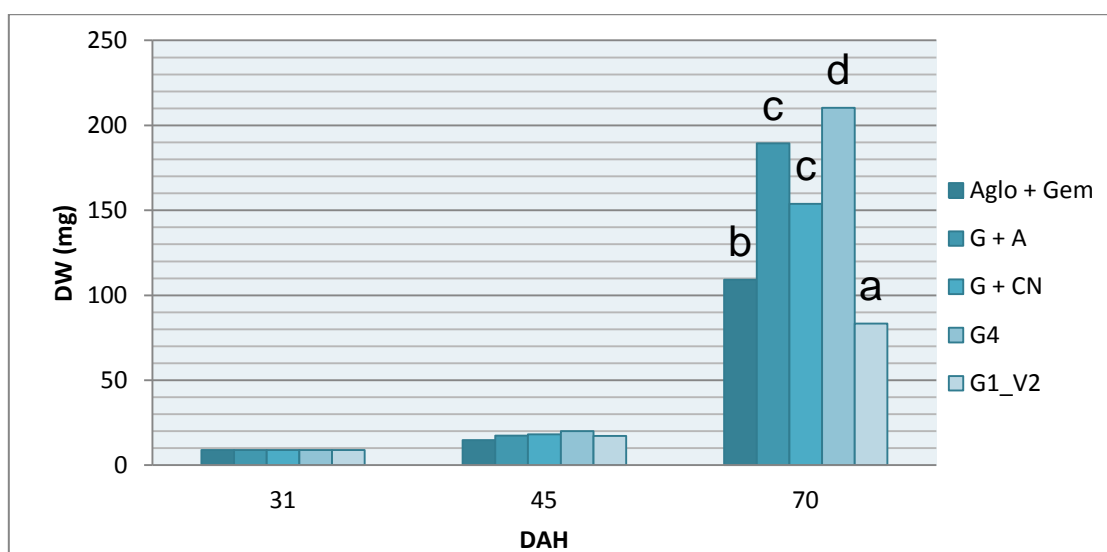
Toda a análise estatística foi feita a considerar o peixe como unidade experimental. Os valores do peso seco (DW) e comprimento total (TL) foram determinados através da média final (Mf) das médias dos 3 tanques que foram submetidos a mesma dieta (Mf = M dos 3 tanques/3). Na tabela 3 é apresentado o comprimento total e peso seco dos peixes aos 31, 45 e 70 DAH.

**Tabela 3 - crescimento médio de cada tratamento\***

	Dieta				
TL (mm)	Aglo + Gem	G+A	G+CN	G4	G1_V2
32 DAH	16,6 ± 2,2 <sup>a</sup>	16,6 ± 2,2 <sup>a</sup>	16,6 ± 2,2 <sup>a</sup>	16,6 ± 2,2 <sup>a</sup>	16,6 ± 2,2 <sup>a</sup>
45DAH	19,5 ± 3,2 <sup>a</sup>	20,1 ± 3,3 <sup>a</sup>	20,4 ± 3,6 <sup>a</sup>	21,2 ± 4,0 <sup>a</sup>	20,2 ± 3,2 <sup>a</sup>
70DAH	34,4 ± 4,3 <sup>b</sup>	43,5 ± 5,5 <sup>d</sup>	40,6 ± 4,1 <sup>c</sup>	45,2 ± 4,5 <sup>e</sup>	30,7 ± 4,7 <sup>a</sup>
Peso seco (mg)	Aglo + Gem	G+A	G+CN	G4	G1_V2
32 DAH	8,9 ± 3,1 <sup>a</sup>	8,9 ± 3,1 <sup>a</sup>	8,9 ± 3,1 <sup>a</sup>	8,9 ± 3,1 <sup>a</sup>	8,9 ± 3,1 <sup>a</sup>
45DAH	14,8 ± 7,5 <sup>a</sup>	17,4 ± 7,3 <sup>a</sup>	18,1 ± 9,1 <sup>a</sup>	20 ± 9,2 <sup>a</sup>	17,2 ± 6,5 <sup>a</sup>
70DAH	109,2 ± 42,2 <sup>b</sup>	189,5 ± 98,7 <sup>c</sup>	153,8 ± 42,3 <sup>c</sup>	210,3 ± 62,6 <sup>d</sup>	83,4 ± 33,0 <sup>a</sup>

\*Os valores estão apresentados como média ± desvio padrão. As médias que estão na mesma linha e que tem a mesma letra associada não apresentam diferenças significativas entre si (P<0,05), n=30.

Através figura 19 é possível perceber a evolução do DW (mg) de cada grupo de peixes ao longo do percurso experimental. Não houve diferenças significativas ao 31 DAH porque foram todos retirados do mesmo lote, logo a média de peso seco inicial é toda igual. Aos 45 DAH não existiram diferenças significativas entre dietas e aos 70 DAH houve diferenças significativas, excetuando a dieta G+A e G+CN que não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre si (quando  $p < 0,05$ ) (tabela 3 e figura 19)

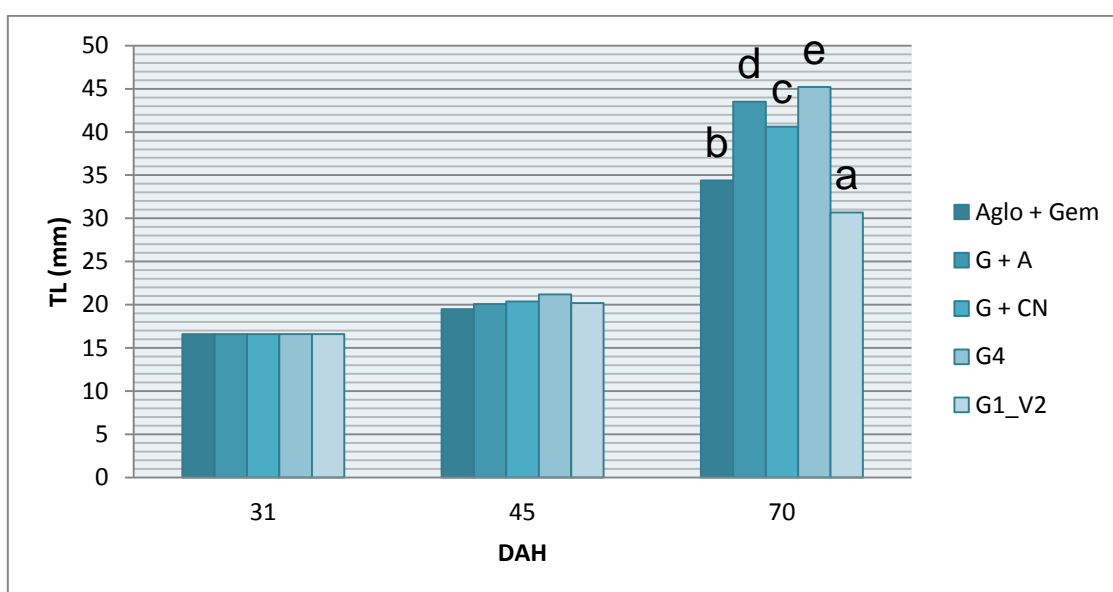


**Figura 199 - Peso seco (mg) aos 31, 45 e 70 DAH dos linguados.** Letras diferentes representam diferenças significativas entre dietas ( $p < 0,05$ ),  $n=30$ .

É possível ver pela figura 19 que aos 70DAH a dieta G1\_V2 é significativamente inferior quando comparada com as restantes, enquanto a G4 foi a que obteve melhores resultados ao resultar na maior média de peso seco final.

Em relação ao TL (mm) dos indivíduos, podemos observar (tabela 3) que na primeira amostragem (31DAH) a média do comprimento total inicial é igual para todos os tratamentos. Contudo é possível ver na figura 20 um crescimento dos indivíduos ao longo do ensaio experimental.

Aos 45 DAH não foram registadas diferenças significativas entre as dietas, ao contrário dos 70DAH em que todas as dietas diferem entre si estatisticamente. Como se observa na figura 20 a dieta G1\_V2 foi a que teve pior prestação de crescimento e a dieta G4 a melhor.



**Figura 20 - Comprimento total (mm) aos 31, 45 e 70 DAH dos linguados.** Letras diferentes representam diferenças significativas entre dietas ( $p < 0,05$ ),  $n=30$ .

Como já foi dito anteriormente, no início do ensaio os lotes experimentais foram preenchidos com base no peso total das larvas, de modo a não comprometer o ensaio e minimizar o surgimento de *stress* nos animais (promovendo o bem estar destes). Deste modo optou-se por quantificar os animais no final do ensaio e para isso fez-se a contagem final dos indivíduos, juntando-se ainda os mortos e os que foram usados para as amostragens. Assim foi possível minimizar os riscos e assegurar um ensaio sem qualquer contratempo. A tabela 4 indica o número inicial de peixes usado em cada tratamento.

**Tabela 4 - Número total de indivíduos no início do ensaio**

<b>Dieta</b>	<b>Tanques</b>	<b>Total de indivíduos</b>
<b>Aglo + Gem</b>	1	983
	11	952
	15	911
<b>G + A</b>	3	833
	7	987
	12	879
<b>G + CN</b>	4	908
	10	880
	13	872
<b>G4</b>	5	978
	8	920
	14	1018
<b>G1_V2</b>	2	862
	6	967
	9	1091

Uma vez obtido o número total de indivíduos no início e fim do ensaio, foi possível determinar a taxa de sobrevivência (Tabela 5).

**Tabela 5 - Taxas de sobrevivência entre os diferentes tratamentos\***

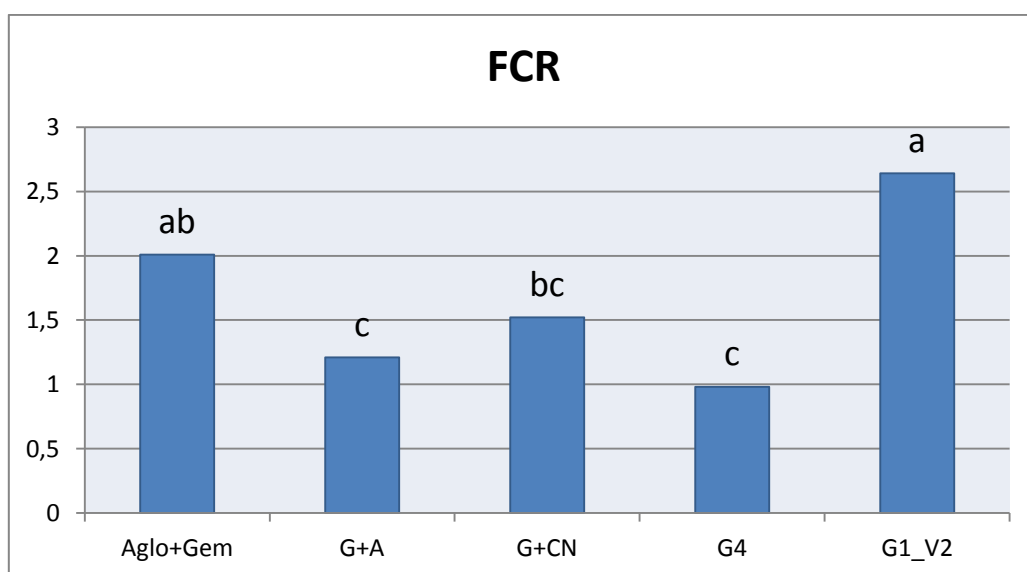
Dietas				
Aglo+Gem	G+A	G+CN	G4	G1_V2
95,4 ± 0,7 <sup>a</sup>	94,8 ± 2,6 <sup>a</sup>	96,8 ± 0,7 <sup>a</sup>	96,8 ± 1,1 <sup>a</sup>	95,6 ± 1,3 <sup>a</sup>

\*Os valores estão apresentados como média ± desvio padrão. As médias que estão na mesma linha e que tem a mesma letra associada não apresentam diferenças significativas entre si (P<0,05), n=30.

A taxa de sobrevivência dos indivíduos foi, no geral, muito alta variando entre os 94,8 e 96,8%. Não houve diferenças significativas entre tratamentos.

### 3.2 Fator de conversão alimentar

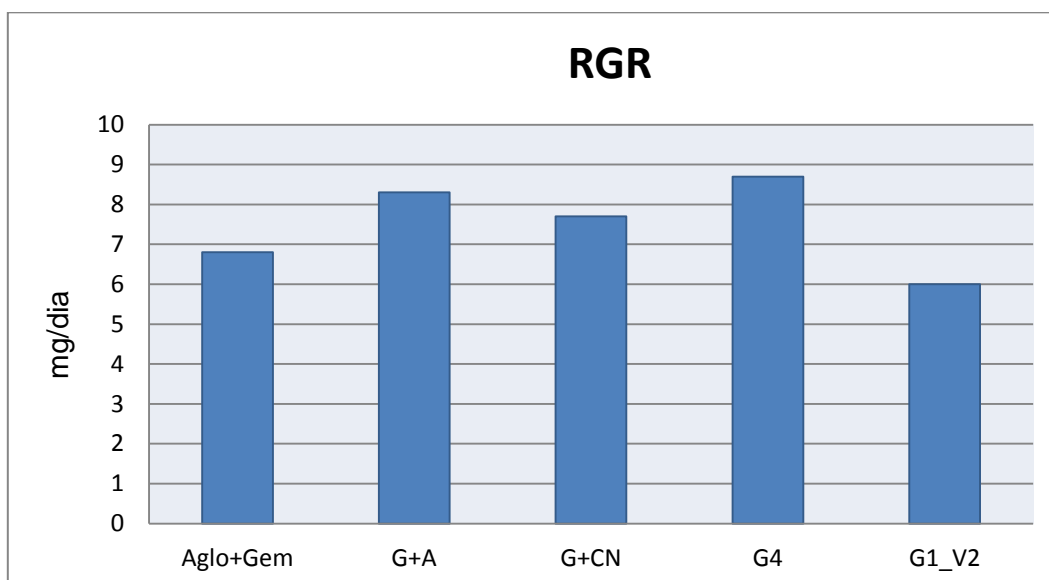
Para analisar o FCR (fator de conversão alimentar) foi preciso proceder com a transformação logarítmica dos valores, visto que não foi verificado homogeneidade de variâncias. Uma vez que o FCR é o inverso de eficiência alimentar (DJ Cottle 2014), a dieta G1\_V2 foi a que obteve menor eficiência seguida da dieta Aglo+Gem (controlo). É possível ver pela figura 21 que existe diferenças significativas entre a dieta G1\_V2 e as dietas G+A, G+CN e G4. Existe também diferenças significativas entre a dieta Aglo+Gem e as dietas G+A e G4. Para finalizar a dieta G+CN foi a que não apresentou diferenças significativas relativamente as dietas Aglo+Gem, G+A, G+CN e G4



**Figura 21 - FCR dos diferentes tratamentos.** Letras diferentes representam diferenças significativas entre as dietas (p <0,05), n=30.

### 3.3 Taxa de crescimento relativa

Para analisar o RGR (taxa de crescimento relativa) foi preciso proceder com a transformação em percentagem dos valores, uma vez que não foi verificada homogeneidade de variâncias. Ao contrário do FCR, o RGR quanto maior for o valor maior é o crescimento gradual dos indivíduos. Desta forma é possível verificar (figura 22) que a que apresenta menor RGR é a dieta G1\_V2 seguida da dieta Aglo+Gem. Existem diferenças significativas entre a dieta G1\_V2 e as dietas G+A, G+CN, G4, como também entre a dieta Aglo+Gem e as dietas G+A e G4. Por outro lado as dietas Aglo+Gem e G+CN não apresentaram diferenças significativas entre si nem as dietas G+A, G+CN e G4. As dietas G4 e G+A foram as que apresentaram melhores RGR.



**Figura 22 - RGR dos diferentes tratamentos.** Letras diferentes representam diferenças significativas entre as dietas ( $p < 0,05$ ),  $n=30$ .

## 4. Discussão

A razão pela qual existe uma necessidade urgente de encontrar alternativas sustentáveis aplicáveis a aquacultura é devido à sobre-exploração dos *stocks* mundiais de peixe proveniente pela pesca. Borges (2014) e Reis (2014) afirmam que uma das alternativas para combater o aumento exponencial do uso e procura das farinhas e óleos de peixe é a sua substituição por óleo e proteína vegetal. Tal como Torstensen (2008) sugere que são necessários 3-5Kg de peixe pescado por cada Kg de peixe de aquacultura produzido, através da sua incorporação nas dietas sob a forma de farinha de peixe, tornando-se numa insustentabilidade ambiental e económica. Rosenlund (2016) estudou as necessidades que o salmão do Atlântico (*Salmo salar*) tem relativamente aos EFA (essential fatty acids), chegando a conclusão que a sua necessidade era entre 2-7% do seu composto dietético (alimento). Desta forma pode-se assegurar que a disponibilidade de ácidos gordos essenciais no meio selvagem é um importante fator para um bom desenvolvimento deste peixe. Por isso invoca-se ao incentivo da aquacultura sustentável que passa pelo uso de dietas com base em ingredientes eticamente e economicamente aceitáveis. As fontes de óleo e proteínas vegetais são as mais promissoras alternativas ao uso de farinha e óleo de peixe, devido à sua grande disponibilidade e estabilidade económica (baixo preço) (Turchini *et al.*, 2009; Borges *et al.*, 2014).

Por outro lado a ausência de ácidos gordos n-3 HUFA e a presença de ácidos gordos monoinsaturados, linoleicos e linolénicos nos óleos vegetais tem limitado ou mesmo negado a sua incorporação em dietas de aquacultura (Jobling, 2011). Desta forma é preciso fazer estudos criteriosos sobre o potencial que o óleo de origem vegetal tem no desenvolvimento, crescimento e bem-estar dos peixes (Turchini *et al.*, 2009; Reis *et al.*, 2014).

No ensaio executado nas instalações da Safistela, Lda., foi testado a substituição de óleos e proteínas marinhas por valores crescentes de óleos e proteínas vegetais nas dietas. Havia dietas com apenas óleos e proteínas marinhas (Aglo+Gem e G+A), com uma substituição total das proteínas marinhas por proteínas vegetais (G1\_V2), com uma substituição moderada de proteínas marinhas por proteínas vegetais (G4) e com uma substituição moderada de óleos marinhos por óleos vegetais (G+CN), em larvas e juvenis de linguado senegalês. Foi realizada uma avaliação do crescimento através do ganho de peso e comprimento dos peixes, ao longo de 39 dias (31 DAH-70 DAH).



Foram feitas 3 amostragens, duas delas comparativas, aos 31 DAH (início), 45 DAH e 70 DAH (fim). Aos 45 DAH não houve diferenças registadas entre os tratamentos experimentais, não podendo assim tirar conclusões acerca das dietas. Aos 70 DAH obteve-se diferenças significativas em quase todos os tratamentos. Quando analisados os dados estatísticos, chegou-se a conclusão que não houve diferenças significativas entre as dietas G+A e G+CN relativamente ao peso seco, enquanto que no comprimento total houve diferenças significativas ( $p < 0,05$ ). Isto pode ir de encontro com o ensaio feito por Borges *et al.* (2014), que testou a substituição total e parcial de óleo de peixe por óleo vegetal e concluiu que esta substituição não afetou o crescimento dos peixes. Em relação às dietas G4 e G1\_V2 tanto no peso seco como no comprimento total houve diferenças significativas, demonstrando que a substituição total de proteína animal por vegetal origina num menor crescimento do indivíduo, podendo levar a conclusão que a substituição total de proteínas animais por vegetais não é aconselhável para um bom desenvolvimento do animal. Este resultado está de acordo com o obtido por Torstensen (2008) que verificou que os tratamentos com maior substituição de farinha de peixe (proteína animal) tinham um crescimento inferior aos que a substituição da farinha de peixe tinha sido menor. Neste estudo foi comparada a dieta controlo Aglo-Gem (proteína e óleo de origem animal) com as dietas G4 e G+CN, que são dietas com uma substituição moderada de proteína e óleos animais por vegetais. Apesar da sua substituição o crescimento dos peixes, tanto em peso seco como em comprimento, submetidos a ambas as dietas foi significativamente superior às que foram submetidas com a dieta controlo. O peso seco médio de uma larva submetida à dieta G4 e G+CN era de 210,3mg e 153,8mg respetivamente, enquanto a larva submetida à dieta Aglo-Gem tinha um peso seco médio de 109,2mg. Quanto ao comprimento total médio de uma larva que sofreu tratamento G4 e G+CN era de 45,2mm e 40,6mm, enquanto a larva que sofreu o tratamento com a dieta controlo tinha um comprimento total médio de 34,4mm. De acordo com o estudo de Torstensen (2008) é possível fazer a substituição parcial das proteínas e óleos de fontes animais existentes nas dietas comerciais por fontes vegetais sem comprometer a *performance* do peixe. Foi também estudado por Aragao *et al.* (2003) que a substituição de farinha de peixe por proteína de soja leva a uma diminuição da aceitação por parte do linguado Senegalês e que, apesar dos valores de RGR terem sido menores quando comparados com os da farinha de peixe, não houve diferenças no peso final em ambas as dietas.

Por outro lado não foram observados diferenças significativas na taxa de sobrevivência dos indivíduos deste ensaio, sendo elas todas muito altas (94,8-96,8%). Isto indica que as dietas de alto crescimento, como a G4, e as de baixo crescimento,

como a G1\_V2, não influenciam na mortalidade dos indivíduos. De acordo com Pinto et al. (2016) dietas com valores baixos de DHA (EFA de origem animal) e lípidos reduzem substancialmente o crescimento do linguado Senegalês, contudo não foi observado diferenças na sobrevivência das pós-larvas em estudo. No geral, é desencorajador o uso de valores baixos de DHA e lípidos nas dietas de desmame do linguado senegalês, uma vez que a redução destes pode comprometer o crescimento das larvas (Pinto et al., 2016).

Outras espécies como a dourada (*Sparus aurata*) apresentam um menor crescimento quando alimentadas com dietas de 100% de substituição de óleo de peixe por óleo vegetal (Benítez-Dorta et al., 2013).

O linguado Senegalês é capaz de sobreviver com dietas baixas em DHA e LC-PUFAs, uma vez que este animal tem baixa necessidade destes componentes nas fases larvares e pós-larvares (Navarro-Guillén et al., 2015; Bonacic et al., 2016; Villalta et al., 2005). Como foi verificado pelo ensaio, as dietas G+A (100% óleo animal) e G+CN (50/50 óleo animal e vegetal) não obtiveram diferenças significativas respetivamente ao peso final dos indivíduos. Isto pode estar relacionado com o facto de as larvas não dependerem de PUFAs para obterem um bom crescimento tanto a nível de peso como de comprimento (Villalta et al., 2005) o que possibilita a introdução de óleos de origem vegetal nas dietas comerciais, baixando o preço destas e rentabilizar a economia de uma empresa.

É de realçar que a composição das dietas testadas não foi completamente fornecida, tornado difícil a discussão dos resultados obtidos neste ensaio. No entanto conclui-se que as dietas com 50/50% de fontes proteicas e de óleos animais e vegetais conseguem obter melhores resultados que a controlo (100% origem animal). Contudo a dieta G1\_V2 que consistia numa fonte inteiramente de proteína vegetal obteve os piores resultados a todos os níveis: peso, comprimento total, taxa de sobrevivência, taxa de conversão alimentar e taxa de crescimento relativo. Embora os resultados obtidos neste estudo sejam promissores, é necessário proceder a um ensaio em maior escala (escala de produção aquícola) para obter validação.

## IV. Conclusão

As instalações da Safistela, Lda. apresentam-se na zona Norte da costa litoral portuguesa, perto da Póvoa de Varzim. Começou por ser uma instalação que produzia pregado (*Psetta maxima*) como principal fonte de rendimento, mas a oportunidade e ideia de negócio surgiu, passando depois a ser a maior maternidade de linguado Senegalês (*Solea senegalensis*) em Portugal. Tem uma capacidade de produção para mais de 5M de juvenis de linguado.

O estágio na Safistela Lda. foi uma experiência incomparável que permitiu evoluir tanto a nível pessoal como profissional. Toda a experiência que foi proposta diariamente na maternidade, permitiu dar a entender um pouco a dificuldade que é gerir e controlar uma instalação piscícola, que vai desde a seleção dos progenitores até ao transporte dos juvenis para outras instalações de produção.

O ensaio, que consistiu em verificar o efeito da dieta no desenvolvimento do juvenil de linguado Senegalês, foi algo desafiante e encorajador, uma vez que se tratava de um ambiente de produção que é bastante diferente de um laboratório. Pode-se por em prática algumas das coisas que se aprende durante o Mestrado que ajuda a lidar com os problemas que foram surgindo durante o ensaio experimental. O tema envolvia a introdução de proteínas e óleos vegetais nas dietas comerciais para produção de peixe. As larvas tiveram ótimos resultados com alguns tratamentos, nomeadamente a dieta G4 que era constituída à base de proteína vegetal e animal. Esta dieta foi a que obteve melhores resultados em todos os parâmetros analisados: peso seco, comprimento total, taxa de sobrevivência, taxa de conversão alimentar e taxa de crescimento relativo, tornando-se numa potencial fórmula comercial. No mercado da aquacultura uma das maiores despesas é a ração administrada aos peixes. Com a introdução de óleos e proteínas de fontes vegetais, o preço destas rações comerciais baixam, tornando o negócio aquícola mais rentável e por sua vez mais sustentável.

Apesar dos resultados obtidos nesta experiência, seria necessário, futuramente, proceder com um ensaio em maior escala (escala de produção) com as dietas mais vantajosas e com isso consolidar e comprovar os resultados aqui obtidos.

## Bibliografia

- Ambrosio, P. P., Costa, C., Sánchez, P. & Flos, R. (2008). Stocking density and its influence on shape of Senegalese sole adults. *Aquaculture International* 16(4): 333-343.
- Aragão, C., Conceição, L. E., Dias, J., Marques, A. C., Gomes, E. & Dinis, M. T. (2003). Soy protein concentrate as a protein source for Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup 1858) diets: effects on growth and amino acid metabolism of postlarvae. *Aquaculture Research* 34(15): 1443-1452.
- Avendaño-Herrera, R., Toranzo, A. E. & Magariños, B. (2006). Tenacibaculosis infection in marine fish caused by *Tenacibaculum maritimum*: a review. *Diseases of Aquatic Organisms* 71(3): 255-266.
- Badiola, M., Mendiola, D. & Bostock, J. (2012). Recirculating Aquaculture Systems (RAS) analysis: Main issues on management and future challenges. *Aquacultural Engineering* 51: 26-35.
- Bedoui, R. (1995). [*Solea senegalensis* (Kaup, 1958) rearing in Tunisia]. *Cahiers Options Méditerranéennes (CIHEAM)*.
- Benítez-Dorta, V., Caballero, M. J., Izquierdo, M., Manchado, M., Infante, C., Zamorano, M. J. & Montero, D. (2013). Total substitution of fish oil by vegetable oils in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) diets: effects on fish performance, biochemical composition, and expression of some glucocorticoid receptor-related genes. *Fish Physiology and Biochemistry* 39(2): 335-349.
- Blonk, R. J., Komen, H., Kamstra, A. & van Arendonk, J. A. (2010). Effects of grading on heritability estimates under commercial conditions: A case study with common sole, *Solea solea*. *Aquaculture* 300(1): 43-49.
- Bœuf, G. (2009). Acclimatization of aquatic organisms in culture. *Fisheries and Aquaculture-Volume IV*: 175.
- Boison, J. & Turnipseed, S. B. (2015). A review of aquaculture practices and their impacts on chemical food safety from a regulatory perspective. *Journal of AOAC International* 98(3): 541-549.
- Bonacic, K., Campoverde, C., Sastre, M., Hachero-Cruzado, I., Ponce, M., Manchado, M., Estevez, A., Gisbert, E. & Morais, S. (2016). Mechanisms of lipid metabolism and transport underlying superior performance of Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858) larvae fed diets containing n-3 polyunsaturated fatty acids. *Aquaculture* 450: 383-396.

- Borges, P., Reis, B., Fernandes, T. J., Palmas, Â., Castro-Cunha, M., Médale, F., Oliveira, M. B. P. & Valente, L. M. (2014). Senegalese sole juveniles can cope with diets devoid of supplemental fish oil while preserving flesh nutritional value. *Aquaculture* 418: 116-125.
- Cabral, H. (2000). Comparative feeding ecology of sympatric *Solea solea* and *S. senegalensis*, within the nursery areas of the Tagus estuary, Portugal. *Journal of Fish Biology* 57(6): 1550-1562.
- Cañavate, J. P., Zerolo, R. & Fernández-Díaz, C. (2006). Feeding and development of Senegal sole (*Solea senegalensis*) larvae reared in different photoperiods. *Aquaculture* 258(1): 368-377.
- Carazo, I. (2013). Reproductive behaviour and physiology of senegalese sole broodstock in captivity. *PhD Thesis, University of Barcelona, Spain*.
- Charo-Karisa, H., Komen, H., Rezk, M. A., Ponzoni, R. W., van Arendonk, J. A. & Bovenhuis, H. (2006). Heritability estimates and response to selection for growth of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in low-input earthen ponds. *Aquaculture* 261(2): 479-486.
- Conceição, L. E., Ribeiro, L., Engrola, S., Aragão, C., Morais, S., Lacuisse, M., Soares, F. & Dinis, M. T. (2007). Nutritional physiology during development of Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture* 268(1): 64-81.
- Coutteau, P., Robles, R. & Spruyt, W. (2001). Ongrowing feed for Senegal sole (*Solea senegalensis* Kaup). In *Contribution Presented at the International Conference Aquaculture Europe 2001*, 58-59.
- Dalsgaard, J., Lund, I., Thorarinsdottir, R., Drengstig, A., Arvonen, K. & Pedersen, P. B. (2013). Farming different species in RAS in Nordic countries: current status and future perspectives. *Aquacultural Engineering* 53: 2-13.
- Das, U. N. (2006). Essential fatty acids-a review. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 7(6): 467-482.
- De Silva, S. S. & Hasan, M. R. (2007). Feeds and fertilizers: the key to long-term sustainability of Asian aquaculture. *FAO Fisheries Technical Paper* 497: 19.
- Dhert, P. & Sorgeloos, P. (1995). Live feeds in aquaculture. *Infofish International* 2: 31-39.
- Dinis, M. (1992). Aspects of the potential of *Solea senegalensis* Kaup for aquaculture: larval rearing and weaning to an artificial diet. *Aquaculture Research* 23(4): 515-520.
- Dinis, M. T. & Reis, J. (1995). Culture of *Solea* spp (*Solea senegalensis* and *Solea solea*). In: Workshop on Diversification in aquaculture, Cyprus, 14-17 June. Cahiers Options Méditerranéennes 16, 1-7.

- Dinis, M. T., Ribeiro, L., Soares, F. & Sarasquete, C. (1999). A review on the cultivation potential of *Solea senegalensis* in Spain and in Portugal. *Aquaculture* 176(1): 27-38.
- Dinis, M. T., Soares, F., Conceição, L., Cañavate, J. P., Anguis, V., Ferreira, P. P., Engrola, S., Navas, J. I., Fernández, J. L. & Hachero, I. (2007). Manual de cultivo de linguado y otros peces planos. Junta Andalucía.
- FAO (2015). Cultured aquatic species information programme for *Solea senegalensis*.
- FAO (2016). In Brief - The State of World Fisheries and Aquaculture. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*: 1-25.
- FEAP (2014). European Aquaculture Production Report. Federation of European Aquaculture Producers, Liege, Belgium.
- Fernández-Díaz, C., Yúfera, M., Cañavate, J., Moyano, F., Alarcón, F. & Díaz, M. (2001). Growth and physiological changes during metamorphosis of Senegal sole reared in the laboratory. *Journal of Fish Biology* 58(4): 1086-1097.
- FishBase (2015). *Solea senegalensis* (Kaup, 1858). Vol. 2016.
- Guzmán, J. M., Norberg, B., Ramos, J., Mylonas, C. C. & Mañanós, E. L. (2008). Vitellogenin, steroid plasma levels and spawning performance of cultured female Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *General and Comparative Endocrinology* 156(2): 285-297.
- Hamre, K., Yúfera, M., Rønnestad, I., Boglione, C., Conceição, L. E. & Izquierdo, M. (2013). Fish larval nutrition and feed formulation: knowledge gaps and bottlenecks for advances in larval rearing. *Reviews in Aquaculture* 5(s1): S26-S58.
- Howell, B., Prickett, R., Cañavate, P., Mañanos, E., Dinis, M., Conceição, L. & Valente, L. (2011). Report of the 5th Workshop on the Cultivation of Soles. *Centre of Marine Sciences (CCMAR), University of the Algarve, Faro, Portugal*: 12.
- Imland, A., Foss, A., Conceicao, L. E., Dinis, M. T., Delbare, D., Schram, E., Kamstra, A., Rema, P. & White, P. (2003). A review of the culture potential of *Solea solea* and *S. senegalensis*. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 13(4): 379-408.
- INE (2014). Statistical data - Agriculture, forestry and fisheries In Vol. 2016 (Ed Portuguese National Institute of Statistics).
- Jobling, M. (2011). Nutrient requirements of fish and shrimp. *National Research Council (NRC): The National Academies Press, Washington, DC*.
- Lavens, P., Coutteau, P. & Sorgeloos, P. (1995). Laboratory and field variation in HUFA enrichment of *Artemia* nauplii. *Larvi* 95: 137-140.
- Lavens, P. & Sorgeloos, P. (1996). *Manual on the production and use of live food for aquaculture*. Food and Agriculture Organization (FAO).

- Lekang, O.-I. (2013). Transport of live fish. *Aquaculture Engineering*. Chichester, UK: John Wiley & Sons: 328-338.
- Lenzi, M. & Salvatori, R. (1989). Management of a module for sole eggs production. In *Aquaculture: A Biotechnology in Progress. Proceedings of the Aquaculture Europe 1987 Conference*. European Aquaculture Society, Bredene, Belgium, 549p.
- Lucas, J. S. & Southgate, P. C. (2012). *Aquaculture: Farming aquatic animals and plants*. John Wiley & Sons 648: 1-120.
- Mabrok, M., Machado, M., Serra, C., Afonso, A., Valente, L. & Costas, B. (2016). Tenacibaculosis induction in the Senegalese sole (*Solea senegalensis*) and studies of Tenacibaculum maritimum survival against host mucus and plasma. *Journal of fish diseases* 39: 1445-1455.
- Martín, I., Rasines, I., Gómez, M., Rodríguez, C., Martínez, P. & Chereguini, O. (2014). Evolution of egg production and parental contribution in Senegalese sole, *Solea senegalensis*, during four consecutive spawning seasons. *Aquaculture* 424: 45-52.
- Mondal, S., Rahman, M., Saha, D., Adhikary, R. & Hossain, M. B. (2013). Present status of good aquaculture practices (GAP) in shrimp farms of South-Western coastal area, Bangladesh. *Middle-East Journal of Scientific Research* 14(6): 873-878.
- Morais, S., Aragão, C., Cabrita, E., Conceição, L. E., Constenla, M., Costas, B., Dias, J., Duncan, N., Engrola, S. & Estevez, A. (2014a). New developments and biological insights into the farming of *Solea senegalensis* reinforcing its aquaculture potential. *Reviews in Aquaculture* 8: 227-263.
- Morais, S., Mendes, A. C., Castanheira, M. F., Coutinho, J., Bandarra, N., Dias, J., Conceição, L. E. C. & Pousão-Ferreira, P. (2014b). New formulated diets for *Solea senegalensis* broodstock: Effects of parental nutrition on biosynthesis of long-chain polyunsaturated fatty acids and performance of early larval stages and juvenile fish. *Aquaculture* 432: 374-382.
- Moreira, N., Soares, S., Valente, L., Castro-Cunha, M., Cunha, L. & de Pinho, P. G. (2014). Effect of two experimental diets (protein and lipid vegetable oil blends) on the volatile profile of Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) muscle. *Food chemistry* 153: 327-333.
- Naessens, E., Pedrazzoli, A., Vargas, V., Townsend, S., Cobo, M. & Dhont, J. (1995). Evaluation of preservation methods for Artemia biomass and application in postlarval rearing of *Penaeus vannamei*: 338-341 in *Larvi* 95: 521 p.
- Navarro-Guillén, C., Moyano, F. J. & Yúfera, M. (2015). Diel food intake and digestive enzyme production patterns in *Solea senegalensis* larvae. *Aquaculture* 435: 33-42.



- Neufeld, M. D., Davis, C. A., Cain, K. D., Jensen, N. R., Ireland, S. C. & Lewandowski, C. (2011). Evaluation of methods for the collection and fertilization of burbot eggs from a wild stock for conservation aquaculture operations. *Journal of Applied Ichthyology* 27: 9-15.
- NOAA (2016). National Oceanic and Atmospheric Administration. Vol. 2016.
- Otubusin, S., Ogunleye, F. & Agbebi, O. (2009). Feeding trials using local protein sources to replace fishmeal in pelleted feeds in catfish (*Clarias gariepinus* Burchell 1822) culture. *European Journal of Scientific Research* 31(1): 142-147.
- Overton, J. L., Steenfeldt, S. J. & Pedersen, P. B. (2010). The effects of grading on the growth and survival of juvenile Dover sole (*Solea solea* L.). *Aquaculture Research* 42(1): 31-39.
- Palazzi, R., Richard, J., Bozzato, G. & Zanella, L. (2006). Larval and juvenile rearing of common sole (*Solea solea* L.) in the Northern Adriatic (Italy). *Aquaculture* 255(1): 495-506.
- Person, L. (1989). Early weaning of marine fish larvae onto microdiets: constraints and perspectives. In *Advances in Tropical Aquaculture, Workshop at Tahiti, French Polynesia, 20 Feb-4 Mar 1989*.
- Pinto, W., Engrola, S., Santos, A., Bandarra, N. M., Dias, J. & Conceição, L. E. (2016). Can Senegalese sole post-larvae effectively grow on low dietary DHA and lipid levels during weaning? *Aquaculture* 463: 234-240.
- Rabassó, M. & Hernández, J. M. (2015). Bioeconomic analysis of the environmental impact of a marine fish farm. *Journal of Environmental Management* 158: 24-35.
- Reis, B., Cabral, E. M., Fernandes, T. J., Castro-Cunha, M., Oliveira, M. B. P., Cunha, L. M. & Valente, L. M. (2014). Long-term feeding of vegetable oils to Senegalese sole until market size: effects on growth and flesh quality. Recovery of fatty acid profiles by a fish oil finishing diet. *Aquaculture* 434: 425-433.
- Rosenlund, G., Torstensen, B. E., Stubhaug, I., Usman, N. & Sissener, N. H. (2016). Atlantic salmon require long-chain n-3 fatty acids for optimal growth throughout the seawater period. *Journal of Nutritional Science* 5: e19, 1-13.
- Sargent, J., McEvoy, L. & Bell, J. (1997). Requirements, presentation and sources of polyunsaturated fatty acids in marine fish larval feeds. *Aquaculture* 155(1): 117-127.
- Sargent, J., McEvoy, L., Estevez, A., Bell, G., Bell, M., Henderson, J. & Tocher, D. (1999). Lipid nutrition of marine fish during early development: current status and future directions. *Aquaculture* 179(1): 217-229.

- Sena, S. D. S., David, S. F. & Albert, G. J. T. (2010). Fish Oils in Aquaculture. In *Fish Oil Replacement and Alternative Lipid Sources in Aquaculture Feeds*, 1-20: CRC Press.
- Tocher, D. R. (2010). Fatty acid requirements in ontogeny of marine and freshwater fish. *Aquaculture Research* 41(5): 717-732.
- Tocher, D. R. & Sargent, J. R. (1984). Analyses of lipids and fatty acids in ripe roes of some northwest European marine fish. *Lipids* 19(7): 492-499.
- Torstensen, B. E., Espe, M., Sanden, M., Stubhaug, I., Waagbø, R., Hemre, G. I., Fontanillas, R., Nordgarden, U., Hevrøy, E. M., Olsvik, P. & Berntssen, M. H. G. (2008). Novel production of Atlantic salmon (*Salmo salar*) protein based on combined replacement of fish meal and fish oil with plant meal and vegetable oil blends. *Aquaculture* 285(1-4): 193-200.
- Turchini, G. M., Torstensen, B. E. & Ng, W. K. (2009). Fish oil replacement in finfish nutrition. *Reviews in Aquaculture* 1(1): 10-57.
- Villalta, M., Estévez, A., Bransden, M. P. & Bell, J. G. (2005). The effect of graded concentrations of dietary DHA on growth, survival and tissue fatty acid profile of Senegal sole (*Solea senegalensis*) larvae during the Artemia feeding period. *Aquaculture* 249(1): 353-365.
- Villamizar, N., Blanco-Vives, B., Migaud, H., Davie, A., Carboni, S. & Sanchez-Vazquez, F. J. (2011). Effects of light during early larval development of some aquacultured teleosts: a review. *Aquaculture* 315(1): 86-94.
- Vinagre, C., Fonseca, V., Cabral, H. & Costa, M. J. (2006). Habitat suitability index models for the juvenile soles, *Solea solea* and *Solea senegalensis*, in the Tagus estuary: Defining variables for species management. *Fisheries Research* 82(1): 140-149.
- Volpe, J. P., Gee, J. L., Ethier, V. A., Beck, M., Wilson, A. J. & Stoner, J. (2013). Global Aquaculture Performance Index (GAPI): The First Global Environmental Assessment of Marine Fish Farming. *Sustainability* 5(9): 3976-3991.
- Zhang, S.-Y., Li, G., Wu, H.-B., Liu, X.-G., Yao, Y.-H., Tao, L. & Liu, H. (2011). An integrated recirculating aquaculture system (RAS) for land-based fish farming: the effects on water quality and fish production. *Aquacultural Engineering* 45(3): 93-102.



**Estágio na maternidade de linguado Safistela, Lda. Otimização das dietas de desmame de *Solea senegalensis* em condições de produção.**

Augusto da Silva Furtado

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR

